

**Intrazelluläre Lokalisation und
photoregulierte Biosynthese
der Carotinoide in einem zellfreien System
aus *Neurospora crassa***

Ursula Mitzka-Schnabel

1978

Intrazelluläre Lokalisation und photoregulierte Biosynthese
der Carotinoide in einem zellfreien System
aus Neurospora crassa

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München



vorgelegt von

Diplom-Biologin

Ursula Mitzka-Schnabel

aus München

Oktober 1978

1. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau
2. Berichterstatter: Prof.Dr.R.R.Theimer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1978



Inhaltsverzeichnis

	Seite:
I. Einleitung	1
II. Material und allgemeine Methoden	10
1. Anzuchtbedingungen von <i>Neurospora crassa</i>	10
2. Versuche zur intrazellulären Verteilung der Carotinoide	11
2.1. Induktion und Synthese der Carotinoide in vivo	11
2.2. Herstellung eines Rohhomogenates	12
2.3. Fraktionierung des Rohextraktes durch differenzielle Zentrifugation	13
2.4. Auftrennung von Zellfraktionen durch Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten	13
2.5. Charakterisierung der Zellfraktionen	15
2.5.1. Messung der Enzymaktivitäten	15
2.5.1.1. Katalase	15
2.5.1.2. Fumarase	15
2.5.1.3. Cytochrom-c-oxidase	16
2.5.1.4. NADH-Cytochrom-c-Reduktase ...	16
2.5.1.5. Succinat-Cytochrom-c-Reduktase	17
2.5.1.6. NADPH-Cytochrom-c-Reduktase...	17
2.5.2. Bestimmung des Proteingehaltes	18
2.5.3. Bestimmung der Saccharosekonzentration.	18
2.5.4. Bestimmung des Carotinoidgehalts	18
3. Nachweis des ^{14}C -MVA-Einbaus in Carotinoide, Sterine und deren Vorstufen	19
3.1. Verseifen des R,S-(2- ^{14}C)Mevalonsäurelactons..	19
3.2. Extraktion der nicht verseifbaren lipophilen Fraktion	19
3.3. Säulenchromatographie	20
3.4. Dünnschichtchromatographie	21
3.5. Messung der Radioaktivität	24
3.6. Verwendete Chemikalien	24

III. Ergebnisse	26
1. <u>Intrazelluläre Lokalisation der Carotinoide</u>	26
1.1. Differentielle Zentrifugation des Rohextraktes und Charakterisierung der Zellfraktionen	27
1.2. Reinigung der partikulären Fraktionen im dis- kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten	35
2. <u>Terpenoidsynthesen in einem zellfreien System aus Neurospora crassa</u>	46
2.1. Einbau von ^{14}C -MVA in die Terpene in vivo ...	46
2.2. Ausarbeitung eines zellfreien Systems	52
2.2.1. Versuchsansatz zur Induktion carotinoid- bildender Enzyme im Mycel und Herstellung eines Zellextraktes	53
2.2.2. Inkubation des zellfreien Systems	54
2.2.3. Einfluß verschiedener Faktoren auf den ^{14}C -Einbau	55
2.2.4. Kinetik des ^{14}C -MVA-Einbaus	57
2.3. Syntheseleistungen des zellfreien Systems	59
2.3.1. Biosynthese und Photoregulation einzel- ner Metabolite des Isoprenoidbiosynthese- weges	59
2.3.2. Nachweis einer Neusynthese von Enzymen im zellfreien System	64
3. <u>Photoregulation der Terpenoidsynthese in einzelnen Zellfraktionen</u>	68
3.1. Lokalisation einzelner Enzyme des Terpenoid- biosyntheseweges	68
3.2. Der lösliche Proteinanteil als Substratquelle für die Phytoensynthetase	73

3.3. Das zellfreie System von Cucurbita pepo als Substratquelle für die Phytoensynthetase.....	79
3.3.1. Biosynthese von GGPP durch Enzyme aus dem Endosperm von Cucurbita pepo	79
3.3.2. Supplementierung des zellfreien Systems aus Neurospora crassa mit dem in vitro-System aus Kürbisendosperm	81
3.3.3. Photoregulation der Phytoen- und Carotinoidsynthese in einzelnen Zellfraktionen	88
3.4. Carotinoidsynthese im zellfreien System	88

IV. Diskussion	92
----------------------	----

V. Zusammenfassung	101
--------------------------	-----

VI. Literatur	105
---------------------	-----

Verwendete Abkürzungen

Amo 1618	= 2-Isopropyl-4-dimethylamino-5-methylphenyl-1-piperidin-carboxylat-methyl-chlorid
ATP	= Adenosintriphosphat
Butyl-PBD	= 2-(4-t-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,2,3,-oxadiazol
Cyt.c	= Cytochrom c
CHI	= Cycloheximid
DMAPP	= Dimethylallylpyrophosphat
DTT	= Dithiothreitol
EDTA	= Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
ER	= Endoplasmatisches Retikulum
F	= Farnesol
FPP	= Farnesylpyrophosphat
FAD	= Flavin-adenin-dinucleotid
G	= Geraniol
GG	= Geranylgeraniol
GGPP	= Geranylgeraniolpyrophosphat
GPP	= Geranylpyrophosphat
IPP	= Isopentenylpyrophosphat
M	= molar
mM	= millimolar
MVA	= Mevalonsäure
NAD	= NAD^+ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form
NADH	= $\text{NADH} + \text{H}^+$ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form
NADP	= NADP^+ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, oxidierte Form
NADPH	= $\text{NADPH} + \text{H}^+$ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduzierte Form
N.crassa	= Neurospora crassa
PEP	= Phosphoenolpyruvat
PPO	= 2,5-Diphenyloxazol
S	= Squalen
TCA	= Trichloressigsäure
Tris	= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

I. Einleitung

Lichtabhängige Prozesse sind im Pflanzenreich weit verbreitet und auf Grund ihrer umfassenden biologischen Bedeutung intensiv untersucht, so z.B. Photosynthese, Phototropismus und Photomorphogenese, aber auch die lichtgesteuerte Biosynthese von Chlorophyll, Antocyanen und Carotinoiden (Lit.s.Mohr et al., 1974 und Rau, 1975). Bei höheren Pflanzen tritt die lichtaktivierte Carotinoidbildung als Teil einer komplexen Photoregulation auf, die zu einer Überlagerung mehrerer gleichzeitiger lichtinduzierter Synthesevorgänge führt (Goodwin, 1967; Schnarrenberger und Mohr, 1970).

Eine obligate Photoregulation der Carotinoidsynthese zeigen zahlreiche Bakterien und bestimmte Pilze. Für eine Aufklärung des zugrundeliegenden Regulationsmechanismus haben diese Organismen gegenüber höheren Pflanzen den Vorteil, daß durch das Fehlen eines Photosyntheseapparates keine weitere Beeinflussung der speziellen Farbstoffbildung zu erwarten ist. Auf Grund eingehender Untersuchungen (Lit.-Übers. s. Batra, 1971; Weeks et al., 1973; Rau, 1975, 1977), läßt sich der Mechanismus der photoregulierten Carotinoidsynthese bei diesen Organismen in 3 zeitlich trennbare Teilschritte gliedern: temperaturunabhängige Photoinduktion, vermutliche Neusynthese von carotinoidbildenden Enzymen und die Synthese der Farbstoffe selbst. Die beiden letzten Prozesse laufen auch im Dunkeln ab, wobei die eigentliche Farbstoffbildung sauerstoffabhängig ist.

Lichtenergie wird zunächst von einem Photoreceptor aufgenommen; bei *Neurospora crassa* und *Fusarium aquaeductuum* scheint dieser ein Flavin oder Flavoproteid (Zalokar, 1954; Rau, 1967a, 1975), bei einigen Bakterien dagegen ein Porphyrin beziehungsweise ein Flavinporphyrinkomplex zu sein (Lit.s.Batra, 1971). Die Photoinduktion ist bei allen untersuchten Organismen temperaturunabhängig, so daß die Primärreaktion des angeregten Photoreceptors einen photochemischen Prozeß, wahrscheinlich eine Photooxidation darstellt; diese könnte dann zur Bildung eines stabilen Produktes, möglicherweise eines "Induktors" führen. Diese Annahme ist jedoch noch weitgehend hypothetisch, während entsprechende Ergebnisse die nachfolgenden Reaktionsschritte besser stützen: Über eine differentielle Genaktivierung und Neusynthese von m-RNA werden die carotinoidbildenden Enzyme de novo synthetisiert, die dann zur Synthese der Carotinoide führen (Lit.s.Rau, 1975).

Die Bildung einer spezifischen m-RNA als Folge einer Photoinduktion konnte bisher durch das Auftreten einer lichtinduzierten poly A-haltigen RNA-Fraktion in *Fusarium aquaeductuum* gezeigt werden (Schrott und Rau, 1977). Eine Spezifizierung der neugebildeten RNA und der Nachweis, daß sie als Matrize für eine in vitro-Proteinsynthese fungieren kann, konnte bisher nicht erbracht werden und bedarf erst der Ausarbeitung eines gereinigten in vitro-Enzymsystems. Indirekte Nachweise für eine Neusynthese von carotinoidbildenden Enzymen nach Photoinduktion wurden mit Hilfe von Inhibitoren der Proteinsynthese gewonnen (Rilling, 1964; Harding und Mitchell, 1968; Lit.-Übers.s.Batra, 1971; Weeks et al., 1973; Rau, 1975). Ein direkter Nachweis für eine de novo-Synthese von einzelnen carotinoidbildenden Enzymen ist aber ebenfalls erst durch ein in vitro-Enzymsystem nach Isolierung und Charakterisierung einzelner Enzyme möglich.

Der letzte Teilschritt stellt die Neusynthese der einzelnen Carotinoide dar. Die gebildeten Carotinoide sind bei einer Vielzahl von Organismen untersucht und im wesentlichen bekannt, so auch bei verschiedenen Wildstämmen von *Neurospora crassa* (Lit.s.Mitzka und Rau, 1977).

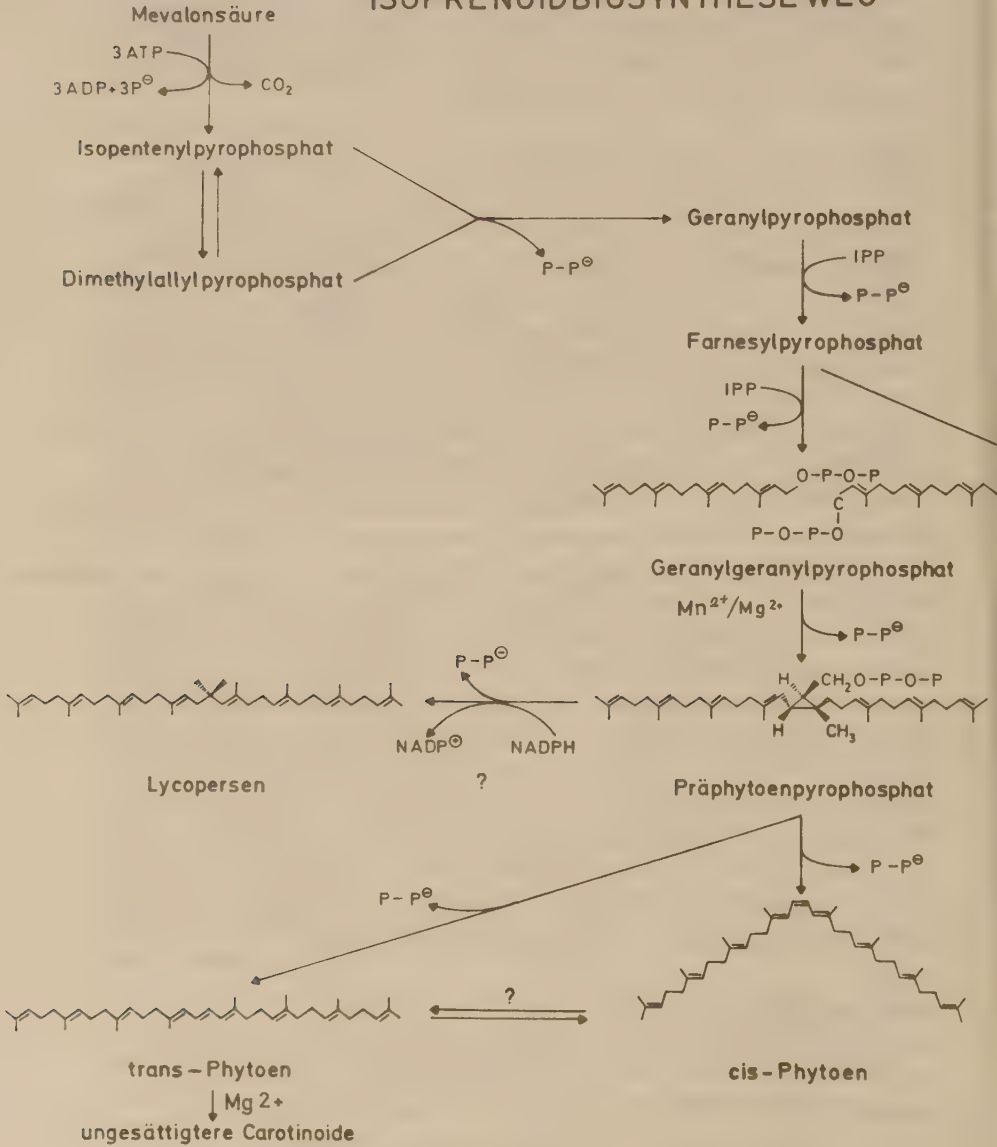
Der allgemeine Biosyntheseweg konnte in den Grundzügen durch zahlreiche Arbeitsgruppen aufgeklärt werden (Lit.-Übers. s.Goodwin, 1971 und Davies, 1975). Aussagen über einzelne Syntheseschritte sind letztlich aber dadurch erschwert, daß bisher nur wenige der beteiligten Enzyme näher untersucht sind. Carotinoid- und Sterinbildung (siehe Abb.1) erfolgen über gemeinsame Vorstufen, von denen Mevalonsäure (MVA) der erste spezifische Metabolit des Terpenoidweges ist; dabei ist nur ein Enantiomer, die 3-R-MVA biologisch aktiv. Die MVA wird durch eine MVA-Kinase stufenweise phosphoryliert und durch das Enzym MVA-5-PP-anhydroxydecarboxylase in Isopentenylpyrophosphat (IPP) übergeführt. Während die MVA-Kinase mehrfach in Pflanzen nachgewiesen wurde, konnte die spez. Decarboxylase aus Hefen gereinigt werden (Lit.-Übers.s.Goodwin, 1971). Durch eine Isomerase steht IPP im Gleichgewicht mit Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP). Eine Prenyltransferase verbindet ein IPP mit einem DMAPP, so daß ein C_{10} -Körper das Geranylpyrophosphat (GPP) entsteht; durch Addition einer weiteren C_5 -Einheit (IPP) an GPP wird Farnesylpyrophosphat (FPP) gebildet. Prenyltransferasen aus Bakterien-, Pflanzen- und Schweineleberpräparationen liegen in der löslichen Fraktion vor (Dorsey et al, 1966; Oster und West, 1968; Ogura et al., 1972; Johnson et al., 1974). Am Farnesylpyrophosphat trennen sich der Carotinoid- und Sterinbiosyntheseweg.

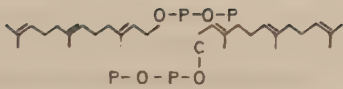
Sterinsyntheseweg (siehe Abb.1): Durch Dimerisation von FPP unter Abspaltung von Pyrophosphat entsteht Präsqualenpyrophosphat (PSPP) und in Gegenwart eines Elektronendonators wie NAD(P)H Squalen. Die gesamte Reaktion wird durch die Squalensynthetase katalysiert. Während die Synthese

Abb. 1

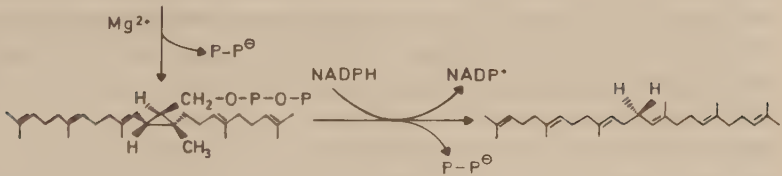
- 4 -

ISOPRENOIDBIOSYNTHESE WEG



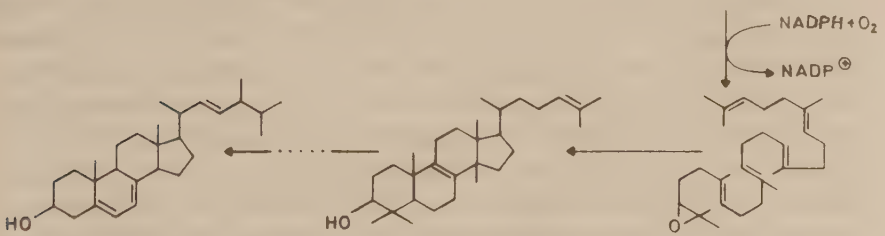


Farnesylpyrophosphat



Präsqalenpyrophosphat

Squalen



Ergosterin

Lanosterin

2,3-Oxisqualen

von Squalen bei tierischen Organismen und höheren Pflanzen neben der Mikrosomalfraktion teilweise auch in der löslichen Fraktion nachgewiesen wurde (Popják, 1969; Lit.-Übers.s. Grunwald, 1975), ist die Squalensynthetase bei Hefe membran- gebunden (Rilling, 1966). Squalen bildet die Ausgangssub- stanz für alle Sterine (Lit. s.Weete, 1973; Grunwald, 1975); sie wird zunächst zum 2,3-Oxisqualen oxidiert, das dann zum Lanosterin bei Pilzen und Tieren bzw. zum Cycloartenol bei Pflanzen zyklisiert. Über mehrere Zwischenstufen werden diese Metabolite in Ergosterin umgewandelt; die einzelnen Schritte sind in Bezug auf die Enzyme bei Pilzen noch wenig untersucht. Bei tierischen Organismen und Pflanzen sind die Enzyme für die Umwandlung von Squalen zu den Sterinen wahrscheinlich an Membrane der Mikrosomalfraktion gebunden (Zusammenfassung s.Morré, 1975).

Carotinoidsynthese (siehe Abb.1): Durch Addition einer weiteren C_5 -Einheit (IPP) an FPP entsteht Geranylgeraniol- pyrophosphat (GGPP). Geranylgeraniolpyrophosphat wird heute allgemein als Prenolvorstufe aller Carotinoide betrachtet (Shah et al., 1968; Lee und Chichester, 1969; Lee et al., 1972; Gregonis und Rilling, 1974; Lit. s.Davies, 1975). Eine GGPP-Synthetase konnte aus *Micrococcus lysodeikticus* (Kandutsch et al., 1964) und Kürbis (Ogura et al., 1972) isoliert werden. GGPP stellt die Ausgangssubstanz für eine Dimerisierungs- reaktion dar, die über Zwischenstufen zur ersten C_{40} -Verbindung mit dem Gerüst der Carotinoide - dem Lycopersen oder Phytoen - führt. Die Bildung von Prälycopersen bzw. Präphytoenpyrophos- phat (PPPP) konnte bei verschiedenen Organismen nachgewiesen werden (Johnson et al., 1974; Qureshi et al., 1973; Barnes et al., 1973). Lycopersen ist offenbar keine obligate Zwi- schenstufe im Biosyntheseweg der Carotinoide; bei *Neurospora crassa* liegen hierfür zum Teil widersprüchliche Angaben vor (Grob et al., 1961; Davies et al., 1963; Goodwin, 1965a). Durch schrittweise Dehydrierung, Ringschluß und Oxidation

entstehen aus dem relativ gesättigten Phytoen die einzelnen Carotinoide; der Biosyntheseweg verläuft dabei nach dem sogenannten Porter-Lincoln-Schema (Porter und Anderson, 1967).

Die Synthese einzelner Carotinoide konnte bisher nur bei einigen Organismen in einem in vitro-System direkt nachgewiesen werden. Über eine intrazelluläre Lokalisation der carotinoidbildenden Enzyme sowie der Carotinoide selber, liegen überdies nur wenige und zum Teil widersprüchliche Befunde vor.

In grünen Pflanzen sind die Carotinoide in Chloroplasten lokalisiert (Lit. s. Goodwin, 1971). Eine in vitro-Synthese im intakten Chloroplasten nach Zugabe von ^{14}C -MVA konnte bisher noch nicht gezeigt werden, da die Chloroplastenmembran offenbar für MVA undurchlässig ist. Indirekte Nachweise für eine Lokalisation aller carotinoidbildenden Enzyme im Chloroplasten ergaben sich nach Extraktion mit organischem Medium: in zerstörten Chloroplasten aus Bohnenblättern wird ^{14}C -MVA in Phytoen eingebaut (Charlton et al., 1967; Buggy et al., 1974).

Ein teilweise gereinigtes lösliches Enzymsystem, das radioaktiv markiertes IPP, FPP und GGPP in Phytoen und andere ungesättigte cyclische und acyclische Carotinoide einbaut, wurde aus Tomatenfruchtplastiden durch die Arbeitsgruppe von Porter isoliert (Shah et al., 1968; Lit.-Zusammenfassung s. Maudinas et al., 1977); daraus wurde kürzlich von Maudinas et al. (1977) ein phytoensynthetisierendes Enzymsystem weiter gereinigt und charakterisiert. In nicht plastidiärem Material wie Zellen aus Kartoffelknollen (Costes et al., 1976) wurden Carotinoide in verschiedenen Zellfraktionen gefunden; sie waren in spezifischen Organellen wie Mitochondrien und Mikrosomen angereichert.

Untersuchungen über die Lokalisation der Carotinoide bei Bakterien zeigen, daß diese wahrscheinlich mit der Cytoplasmamembran assoziiert sind (Lit. s. Batra, 1971). Eine lösliche Enzymfraktion (270 000 x g - Überstand) aus *Halobacterium cutirubrum* baut radioaktives MVA oder IPP in Phytoen und ungesättigte Carotinoide ein (Kushwaha et al., 1976). In *Mycobacterium* sp. konnte eine Phytoensynthese aus ^{14}C -GGPP in Extrakten aus belichteten Zellen nachgewiesen werden; die Enzyme lagen dabei in einem 25 000 x g Überstand vor (Gregonis und Rilling, 1973; Johnson et al., 1974).

Bei Pilzen erbrachten Untersuchungen über die Lokalisation von Carotinoiden widersprüchliche Ergebnisse; die Pigmente wurden entweder in einem einzigen Organell z.B. in Mitochondrien (Neupert und Ludwig, 1971; Keyhani et al., 1972) oder in mehreren Organellen und zwar überwiegend in Lipidglobuli gefunden (Zalokar, 1969; Herber, 1974; Riley und Bramley, 1976).

Enzymaktivitäten für die Carotinoidsynthese wurden bei *Phycomyces* in einer ungereinigten Enzymlösung nach Zugabe von ^{14}C -MVA oder ^{14}C -GGPP (Yokoyama et al., 1962; Lee und Chichester, 1969), sowie in einem 10 000 x g Überstand nachgewiesen (Bramley und Davies, 1975). Zellfreie Extrakte aus *Fusarium aquaeductum* (Mende, 1976) und einer Mutante von *Neurospora crassa* (Bobowski et al., 1977) erbrachten nur eine minimale Phytoensynthese. Ungeklärt ist die Frage, ob bei Pilzen der Syntheseort für die Carotinoide identisch ist mit der Verteilung der Carotinoide nach Abschluß der Pigmentsynthese, oder ob möglicherweise ein intrazellulärer Transport von einem Synthese- zu einem Speicherort stattfindet, wie er für Sterine postuliert wird (Morre, 1975).

In den wenigen Organismen die bisher als Enzymquelle für ein zellfreies System erfolgreich verwendet wurden, ist aber nun

mit Ausnahme von *Mycobakterium* die Carotinoidsynthese überhaupt nicht, oder zumindestens nicht strikt photoreguliert. Ein erster Hinweis für eine Photoregulation einzelner Enzyme konnte bisher in einem zellfreien System nur bei *Myco-*bakterium erbracht werden (Johnson et al., 1974). Bei diesem Bakterium ist die Präphytoensynthetase vollständig lichtinduziert, während die GGPP-Synthetase in Zellen unter lichtinduzierten Bedingungen eine viel höhere Aktivität aufweist als in Dunkelkulturen.

Wie bereits eingangs gesagt wurde, ist eine der notwendigen Voraussetzungen für eine erfolgversprechende Aufklärung des Mechanismus der photoregulierten Carotinoidsynthese - z.B. für den eindeutigen Nachweis einer spezifischen m-RNA oder einer *de novo*-Synthese der Enzyme - die Isolierung und Charakterisierung der carotinoidbildenden Enzyme aus einem Organismus mit obligater Photoregulation der Pigmentbildung. Als wesentlicher Schritt in dieser Richtung sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit versucht werden, bei *Neurospora crassa* die Carotinoide in einzelnen Zellbestandteilen zu lokalisieren und ein zellfreies System für die Carotinoidsynthese auszuarbeiten. Falls beides gelingt, konnte gehofft werden, durch entsprechende Kombination der gewonnenen Daten anschließend auch den Sitz der Enzymaktivität näher zu lokalisieren und ihre Lichtabhängigkeit nachzuweisen.

II. Material und allgemeine Methoden

1. Anzuchtbedingungen von Neurospora crassa

Versuchsobjekt war ein Wildstamm von *Neurospora crassa* (Strain ATCC 10816; Herkunft: Centralbureau voor Schimmeldkulturen, Baarn; Holland), der bereits in früheren Untersuchungen verwendet wurde (Rau et al., 1968). Die Anzucht von *Neurospora* wurde folgendermaßen modifiziert (Mitzka und Rau, 1977): Zur Bildung von Luftmycel mit Kondiosporen wurde junges Mycel (1 Tag bei 34°C angewachsen) mit dem Agarblöckchen auf festen Agarnährboden überimpft und 3 Tage bei 34°C inkubiert. Eine Sporensuspension erhielt man hier- von durch Abschwemmen mit einer sterilen 2 %igen Lösung von Tween 40 und nachfolgender Filtration über eine Glas- wollesäule; durch Tween konnte außerdem bei den folgenden Schritten eine Konidienbildung unterdrückt werden. Für Sub- merskulturen wurde flüssiges Nährmedium (400 ml Nährlösung in 1 l Fernbachkolben) mit einer Sporenendkonzentration von ca. 5×10^6 /ml Medium beimpft und anschließend 22 Std. auf einer Reziproschüttelmaschine mit ca. 70 Schüttel- bewegungen/min im Dunkeln bei konstanter Temperatur (27°C $\pm$ 1) bebrütet. Das flüssige Nährmedium hatte dabei pro Liter Aqua dest. folgende Zusammensetzung (Frost, 1962): Fries'sche Nährsalze (5,0 g Ammoniumtartrat; 1,0 g NH_4NO_3 ; 1,0 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g NaCl; 0,1 g CaCl_2 nach Vogel (1956)), ergänzt mit 15 ml Glycerin; 2,5 g Glucose; 2,5 ml Malzextrakt; 0,5 g Bacto-Pepton und 2,5 g Hefeextrakt. Das Nährmedium wurde im entsprechenden Fall durch Zusatz von 1,8 % Agar (Serva) verfestigt.

2. Versuche zur intrazellulären Verteilung der Carotinoide

2.1. Induktion und Synthese der Carotinoide in vivo

Das 22 Std. alte Pilzmycel wurde durch Abfiltrieren der Nährlösung mittels eines Büchner-Trichters unter mehrmaligem Waschen gesammelt, in dest. Wasser resuspendiert und durch kräftiges Schütteln homogenisiert. Ein Aliquot dieser Suspension wurde zur Trockengewichtsbestimmung verwendet.

Sämtliche Arbeitsgänge erfolgten bei einem für die Lichtinduktion unwirksamen, schwachen Rotlicht (Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W, Lichtfarbe 15, davor rote Plexiglasscheibe Röhm und Haas, Darmstadt, Nr. 501)

Für den Versuchsansatz wurden 75 ml der Pilzsuspension in 250 ml Gaswaschflaschen pipettiert, in denen bereits 75 ml Puffer-Glucose-Lösung (Endkonzentration: $\frac{1}{60}$ M KH_2PO_4 und 0,05 M Glucose) vorlagen. Zur Belichtung wurden die Gaswaschflaschen zwischen 2 Aggregaten aus je 3 horizontal übereinander angeordneten Leuchtstoffröhren (Osram, 65 W, Lichtfarbe 15, mit Reflektor) mit einer Lichtintensität von je 16 000 Lux aufgestellt. Eine optimale Sauerstoffversorgung des Mycels während der Belichtung wurde durch ständigen Gasdurchstrom erreicht, der zudem noch für eine gleichmäßige Belichtung der Hyphen sorgte. Ein Ventilator hielt die Temperatur der Suspension nahezu konstant. Die Lichtinduktionszeit betrug ca. 30 min; anschließend wurden je 400 ml Pilzsuspension in 1 Liter-Fernbachkolben übergeführt und bis zum Abschluß der Pigmentsynthese - mindestens 6 Std. (Rau et al., 1968) - auf einer Schüttelmaschine im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Da zur Untersuchung der Verteilung der Carotinoide nur maximale Pigmentsynthese erforderlich war, wurde in einigen Versuchen das Mycel in Puffer-Glucose-Lösung direkt in Fernbachkolben auf einer Schüttelmaschine mit 2 Leuchtstoffaggregaten ca. 3 Std. belichtet und anschließend bis zum Abschluß der Farbstoffsynthese im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen.

2.2. Herstellung eines Rohhomogenates

Nach Abschluß der Pigmentsynthese wurde das Pilzmycel von der Versuchslösung abfiltriert, 4 mal mit kaltem dest. Wasser gewaschen, um Reste von Tween zu entfernen, nochmals mit Extraktionspuffer nachgewaschen und die feuchte Mycelscheibe zur Bestimmung des Frischgewichtes gewogen. Zur Homogenisierung wurde das Pilzmycel kurz vorgekühlt und alle folgenden Arbeitgänge bei 0-5 °C durchgeführt. Eine Zerstörung der Carotinoide durch Licht wurde durch teilweise Abdunklung während der Aufarbeitung möglichst gering gehalten.

Nach mehrfacher Erprobung verschiedener Aufschlußmethoden mit Hilfe von Reibschale (mit und ohne Seesand), Potter-Elvehjem-Homogenisator oder Ultraschall bei Verwendung verschiedener Extraktionspuffer erwies sich folgende Methode im Hinblick auf die Extrahierbarkeit des Mycels und die Erhaltung der Aktivität der Enzyme des Isoprenoidbiosyntheseweges als gut geeignet:

Das Mycel (ca. 30-60 g Frischgewicht) wurde in einer Reibschale mit dem 1,5-2-fachen Gewichtsvolumen an eiskaltem Extraktionsmedium und mit nachgereinigtem Seesand (Merck, 5 g pro 20 g Frischgewicht) mit einem Pistill 8 min lang kräftig zu einem homogenen Brei zerrieben. Das Extraktionsmedium hatte folgende Zusammensetzung (variiert nach Neupert und Ludwig, 1971):

0,44 M Saccharose; 2 mM EDTA; 0,02 M Dithioerythrit;
0,01 M Tris-HCl, pH 7,4.

Dithioerythrit wurde in einigen Versuchen weggelassen, ohne daß ein deutlicher Einfluß auf die Enzymaktivitäten zu erkennen war. Das Homogenat wurde 10 min lang bei 500 x g in "swing out"-Bechern zentrifugiert. Das Sediment, das intakte Zellen und Zellbruchstücke enthält, wurde verworfen und der resultierende Überstand, im folgenden als Rohextrakt bezeichnet, abpipettiert.

2.3. Fraktionierung des Rohextraktes durch differentielle Zentrifugation

Der Rohextrakt wurde durch differentielle Zentrifugation nach dem in Abb. 2 dargestellten Schema in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Die Überstände wurden dabei sorgfältig abpipettiert, das jeweilige Sediment 1-2 mal mit Extraktionspuffer gewaschen, mit einem Glasstab in Extraktionsmedium resuspendiert und in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem mit Teflon- bzw. Glaspistill per Hand vorsichtig homogenisiert. Nach Zentrifugation bei $115\,000 \times g_{av}$ über 60 min konnte eine kompakte Lipidschicht weitgehend vom Überstand durch Abpipettieren getrennt werden.

2.4. Auftrennung von Zellfraktionen durch Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten

Einzelne carotinoidhaltige partikuläre Fraktionen wurden durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten weiter gereinigt. Ein Aliquot (ca. 4 ml) der jeweiligen Fraktion, dessen Saccharosekonzentration bei 13,1 % (w/w) lag, wurde auf einen diskontinuierlichen Gradienten geschichtet, der zuvor aus folgenden Stufen aufsteigender Saccharosekonzentrationen (w/w) in 0,002 M EDTA und 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4 aufgebaut wurde: 3 ml 60 %ige, 5 ml 45 %ige, 8 ml 35 %ige, 7 ml 30 %ige und 8 ml 21 %ige (w/w) Saccharose; dies entspricht einem Dichtebereich von $1,085 \text{ g/cm}^3$ bis $1,296 \text{ g/cm}^3$ (bei 0°C).

Die Zentrifugation des Gradienten erfolgte in der WKF Ultrazentrifuge mit "swing out"-Rotor ($3 \times 34 \text{ ml}$) oder einer Beckman Ultrazentrifuge mit dem Ausschwingrotor SW 27 bei einer mittleren Schwerkraft von $60\,100 \times g$ über einen Zeitraum von 135 min.

Nach der Zentrifugation wurden die Gradientenfraktionen mit einem Isco-Gradientenfraktionator durch Hochdrücken mittels 60 %iger (w/w) Saccharose (angefärbt mit Methylenblau) in 1 ml Fraktionen gesammelt.

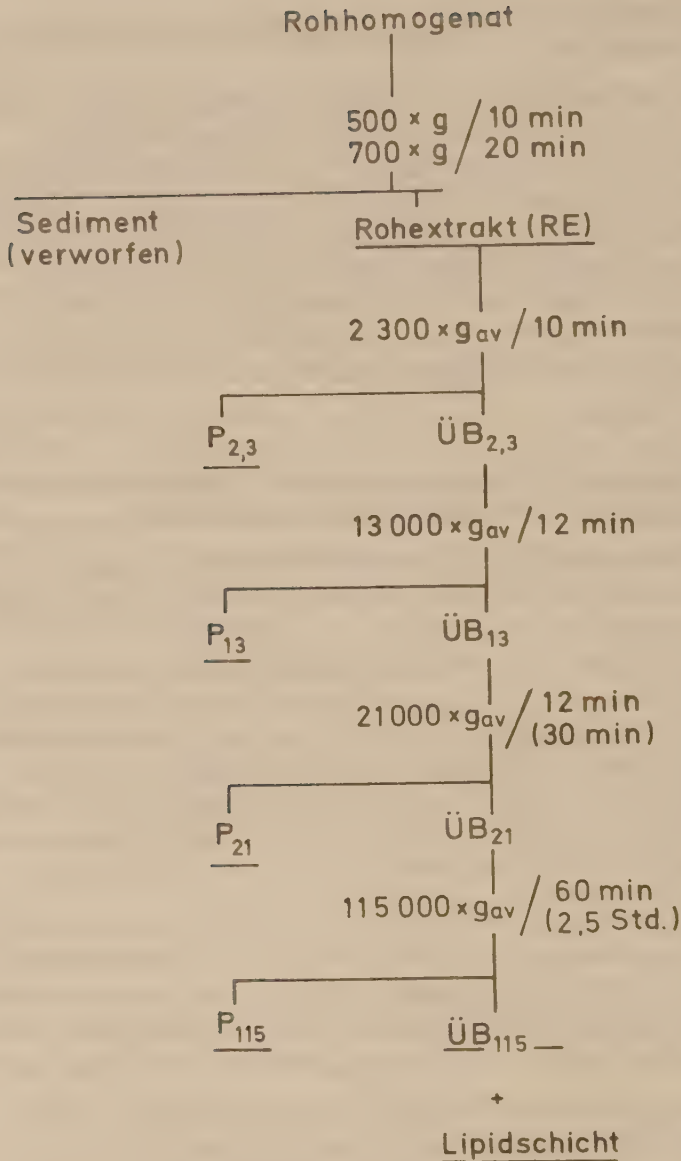


Abb.2:

Schema für die differentielle Zentrifugation des Rohextraktes von *Neurospora crassa* mit der Ultrazentrifuge WKF P 50 K.

2.5. Charakterisierung der Zellfraktionen

Die einzelnen durch differentielle Zentrifugation gewonnenen Zellfraktionen sowie die jeweiligen Gradientenfraktionen wurden durch Aktivitätsbestimmung von Markerenzymen charakterisiert und die Menge an Carotinoiden bestimmt.

2.5.1. Messung der Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden durch photometrische Testmethoden mit Hilfe eines Beckman Spektralphotometers (Modell 24) beziehungsweise eines Gilford Spektralphotometers (Modell 2400 S) für Katalase bei Raumtemperatur ermittelt. Die Angabe der einzelnen einpipettierten Substanzen bezieht sich auf Molaritäten.

2.5.1.1. Katalase

(H_2O_2 : H_2O_2 -Oxidoreductase, E.C.1.11.1.6)

(Bestimmung nach Lück, 1965)

Zu 1 ml frisch zubereiteter 0,01 M H_2O_2 -Lösung in 0,06 M Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 0,01 % Triton-X-100 wurden 20-50 μl Enzymlösung zugegeben. Die Anfangsrate der Zersetzung des H_2O_2 (ca. 20 sec) wurde bei einer Wellenlänge von 240 nm im Spektralphotometer verfolgt. Der Extinktionskoeffizient des H_2O_2 ist $3,9 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

2.5.1.2. Fumarase

(L-Malat-Hydrolase E.C. 4.2.1.2)

Die Bildung des Fumarats wurde im Rückwärtstest nach Racker (1950) bei λ 240 nm verfolgt.

Testgemisch in 1 ml Endvolumen:

Phosphatpuffer, pH 7,0

47 mM

mit 0,02 % Triton-X-100

Na-Malat

5 mM

Enzymlösung

5-50 μl

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet.

Der Extinktionskoeffizient ist $2,44 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

2.5.1.3. Cytochrom-c-oxidase

(Ferrocytochrom-c-oxygen-oxidoreductase E.C.1.9.3.1)

(Bestimmung variiert nach Schnarrenberger et al., 1971
und Bandlow, persönl. Mitteilung)

Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1,55 ml folgende Substanzen:

Phosphatpuffer, pH 7,0	0,1 M
Cytochrom c, reduziert	0,06 %
Tween 85-Lösung	0,01 %
Enzymlösung	5-50 μ l
KCN	0,45 mM

Unmittelbar vor Testbeginn wurde eine 1,5 mM Cytochrom-c-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) mit einer 3 mM Na-Dithionit-Lösung reduziert, so daß das Absorptionsverhältnis von λ 550 nm/565 nm bei 9-10 lag.

Enzym- und Tweenlösung wurden zunächst 1 min vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Cytochrom c gestartet und unmittelbar die Oxydation des Cytochrom c bei λ 550 nm verfolgt. Um die KCN-Sensitivität der Reaktion zu untersuchen, wurde die Reaktion ohne Vorinkubation durch Cytochrom c gestartet und nach 1 min die KCN-Lösung (10 μ l) zugegeben. Die Aktivität (nmoles $\times$ min⁻¹) ausgedrückt als Anfangsrate einer Reaktion 1. Ordnung wurde nach Schnarrenberger et al. (1971) berechnet. Molare Extinktionskoeffizienten von Cytochrom c bei 550 nm sind dabei $\epsilon_{\text{red}} = 28,4 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$ und $\epsilon_{\text{ox}} = 8,1 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

2.5.1.4. NADH-Cytochrom-c-Reduktase

(Antimycin A-insensitiv; E.C.1.6.99.3)

(Bestimmung nach Lang et al., 1974)

Im Testansatz (2,0 ml) waren enthalten:

Phosphatpuffer	0,1 M
mit EDTA, pH 7,4	1,0 mM
KCN	0,45 mM
Cytochrom c, oxidiert	0,1 mM
NADH	0,25 mM
Enzymlösung	10-50 μ l
Antimycin A	20 μ g

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und die Reduktion des Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt. Nach 1,5 min wurde Antimycin A zugegeben und die Reaktion der Antimycin-insensitiven NADH-Cytochrom-c-Reduktase verfolgt.

Der Extinktionskoeffizient ist $18,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

2.5.1.5. Succinat-Cytochrom-c-Reduktase

(Antimycin A-insensitiv; E.C. 1.3.99.1)

(Bestimmung nach Lang et al., 1974)

Der Testansatz (2,0 ml) enthielt:

Phosphatpuffer	0,1	M
mit EDTA, pH 7,4	1,0	mM
KCN	0,45	mM
Cytochrom c, oxidiert	0,1	mM
Succinat	25	mM
Enzymlösung	10-50	µl
Antimycin A	20	µg

Der Reaktionsablauf wurde in der gleichen Weise wie unter 2.5.1.4. verfolgt.

2.5.1.6. NADPH-Cytochrom-c-Reduktase

(NADP:Ferricytochrome-c(b5)-Oxidoreductase E.C.1.6.2.a)

(Bestimmung nach Sottocasa et al., 1967)

Das Testgemisch von 3 ml Endvolumen enthielt:

Phosphatpuffer, pH 7,5	50	mM
mit KCN (frisch angesetzt)	0,5	mM
NADPH	0,1	mM
Cytochrom c, oxidiert	0,1	mM
Enzymlösung	10-50	µl

Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Extraktes gestartet und die Reduktion des Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient ist $18,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

2.5.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951); als Standard diente eine Lösung von Rinder-serumalbumin.

Bei einem Teil der Versuche erfolgte zusätzlich eine Bestimmung der Proteinkonzentration durch Trübungsmessung nach Fällung mit TCA. Hierzu wurde 1 ml Proteinlösung mit 1,5 ml 10 %iger TCA versetzt und die Extinktion nach 30 sec bei λ 420 nm gemessen. (Linearität von Trübung und Proteingehalt von 0,1 mg/ml bis 3 mg/ml.)

2.5.3. Bestimmung der Saccharosekonzentration

Die Saccharosekonzentration wurde durch Messung des refraktiven Index in einem auf Saccharose geeichten Refraktrometer (Fa. ATAGO) bei 0°C bestimmt und die jeweilige Dichte einer Eichkurve (Tabellen der Firma ISCO) entnommen.

2.5.4. Bestimmung des Carotinoidgehalts

Zur Ermittlung der Menge an Carotinoiden in den einzelnen Fraktionen wurde ein Aliquot des wässrigen Extraktes im Scheidetrichter mit einem Methanol-Acetongemisch (1:1) ausgeschüttelt und nach 15-30 min mit Hilfe von 10 %iger Ammoniumsulfatlösung in Petroläther (Kp. 30-50°C) übergetrieben. Nach mehrmaligem Waschen (dest. Wasser) wurde die Petrolätherphase über Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet, bei 25°C bis zur Trockne eingedampft (BÜCHI-Vakuumrotationsverdampfer) und sofort in einem bestimmten Volumen Petroläther wieder aufgenommen. Die Absorptionsmessung des Farbstoffes ("Gesamtextrakt") erfolgte im Bereich von λ 320-520 nm in einem selbstregistrierenden Spektralphotometer (Beckman Modell 24). Als Maß für die Farbstoffmenge diente die Extinktion im Absorptionsmaximum (Spektralphotometer Zeiss PMQ II). Als Extinktionskoeffizient $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ des Gesamtextraktes wurde 2000 angesetzt, was dem Durchschnittswert aus den $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ -Werten der einzelnen Carotinoide unter Berücksichtigung ihres Anteils entspricht.

3. Nachweis des ^{14}C -MVA-Einbaus in Carotinoide, Sterine und deren Vorstufen

3.1. Verseifen des R,S-(2- ^{14}C)-Mevalonsäurelactons

Die Synthese der einzelnen Terpene wurde mit Hilfe des Einbaus von ^{14}C -MVA verfolgt. Die radioaktiv markierte Mevalonsäure wurde als Lacton bezogen und mußte vor ihrer Verwendung aus diesem durch Verseifen freigesetzt werden. Dies geschah nach folgender Methode (Britton und Goodwin, 1971): Das in Benzol gelöste R,S-(2- ^{14}C)-Mevalonsäurelacton wurde pro mg MVA mit 0,5 ml H_2O und 0,77 ml einer 0,01 M KOH-Lösung versetzt. Das Benzol wurde im Wasserbad bei 50°C unter einem leichten Stickstoffstrom ausgetrieben und damit das entstehende R,S-MVA-Isomerengemisch in die wässrige Phase gebracht. Die spezifische Aktivität der verwendeten MVA lag bei 84 μCi pro mg.

3.2. Extraktion der nicht verseifbaren lipophilen Fraktion

Nach Beendigung der Inkubation eines Enzymextraktes mit ^{14}C -MVA wurde die wässrige Lösung verseift und anschließend die gebildeten und radioaktiv markierten Substanzen extrahiert. Zur Verseifung wurde der wässrige Aceton-Äthanol-Extrakt (17,5 ml) mit 3,5 ml 60 %iger (w/v) KOH (in Methanol) versetzt und unter Stickstoff über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen.

Zur Extraktion der lipophilen Substanzen (variiert nach Graebe, 1968 und Mende, 1976) wurden dann zum verseiften Extrakt 50 ml Aceton zugegeben und 5 min bei ca. 500 x g zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde 4 mal in 6 ml Aceton/Methanol (3:1) resuspendiert und erneut jedesmal zentrifugiert. Der Zentrifugationsrückstand wurde in Aceton resuspendiert und davon ein Aliquot über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) abfiltriert, getrocknet und die Radioaktivität im Dioxancocktail gemessen. Der Rückstand war nach dieser Methode frei von Radioaktivität. Die Überstände aus allen Zentrifugationen wurden gesammelt und im Scheidetrichter vereinigt.

Durch Zugabe von unmarkierten Carrierpigmenten aus *Neurospora* (5 µg pro Probe) sollte eine Zerstörung der radioaktiv markierten Carotinoide durch Sauerstoff und Licht auf ein Minimum reduziert und andererseits die chromatographische Identifizierung erleichtert werden.

Die neutralen Lipide wurden nach Zugabe von 5 ml 0,5 M NaHCO_3 -Lösung und 10 %iger Ammoniumsulfatlösung 3 mal mit ca. 15 ml Petroläther (Kp. 40-60°C) extrahiert, die Petrolätherphasen abgetrennt, die zurückbleibende Lösung durch 3 ml Eisessig und etwas Wasser angesäuert und die sauren Lipide erneut 2 mal mit Petroläther (je 15 ml) extrahiert. Die vereinigten Petrolätherphasen wurden 2 mal mit dest. Wasser gewaschen, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, eingeeengt und in 20 ml Petroläther gelöst. Von einem Aliquot dieser nicht verseifbaren lipophilen Fraktion wurde im Toluolcocktail die Radioaktivität bestimmt. Darüberhinaus wurde die Radioaktivität von einem Aliquot aus der wässrigen Acetonphase und dem Waschwasser im Dioxancocktail bestimmt.

3.3. Säulenchromatographie

Die nicht verseifbaren Lipide wurden auf ein geringes Volumen (ca. 2 ml) eingeeengt und auf einer desaktivierten Aluminiumoxidsäule : Brockmann-Grad III (wassergekühlte Chromatographiesäule; Ø 14 mm, h: 50 mm entsprechend 5 g Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral, Bezugsquelle Merck) chromatographiert. Das Entwicklergemisch bestand aus Petroläther (Kp. 40-60°C) mit ansteigenden Konzentrationen (v/v) von Diethyläther (variiert nach Goad und Goodwin, 1966 bzw. Mende, 1976): 50 ml reiner Petroläther, 50 ml 2 %, 80 ml 12 % bzw. je 50 ml 6 % und 12 % Diethyläther in Petroläther und 50 ml 100 % Diethyläther. Die Zusammenstellung des Entwicklergemisches variierte je nach Fragestellung der einzelnen Versuche; in einigen Versuchen wurde die 12 %-Ätherfraktion durch eine 6 %-Ätherfraktion weiter aufgetrennt, um den geringen Anteil der Prenole von den Sterinen abtrennen zu können.

In den einzelnen Fraktionen wurden folgende Substanzen durch Chromatographie mit authentischen Vergleichssubstanzen und durch ihre Absorptionsspektren identifiziert:

0 %-Ätherfraktion: Squalen, Phytoen, Phytofluen, ζ -Carotin, β -Carotin,

2 %-Ätherfraktion: ungesättigtere Carotinoide

12 %-Ätherfraktion: Geraniol, Farnesol, Geranylgeraniol, Lanosterin, 4-Monomethylsterine und ein Teil des Ergosterins

100 %-Ätherfraktion: Ergosterin

Auf der Säule verblieb das saure Neurosporaxanthin.

Die Identifizierung von Phytoen in der 0 %-Ätherfraktion erfolgte durch Chromatographie auf einer desaktivierten Aluminiumoxidsäule Brockmann-Grad I-II (variiert nach Kushwaha et al., 1970), die eine gute Trennung der Bestandteile dieser Fraktion ermöglicht. Für die Trennung der zwei Isomeren des Phytoens wurde eine Aluminiumoxidsäule Brockman-Grad I (0 % H_2O desaktiviert) verwendet (Thang et al., 1972). Die ungesättigten Carotinoide wurden auf einer Säule mit dem Adsorbens Calciumhydroxid und Hyflo-Super-Cel im Verhältnis 5:1 getrennt; das Entwicklergemisch bestand aus 0-30 % Benzol in Petroläther (Kp. 40-60°C), nach Bindl et al., 1970.

Die Sterine wurden zusätzlich durch den Liebermann-Buchard-Test identifiziert (nach Goad und Goodwin, 1966). Zu der jeweiligen Sterinfraktion wurde 19 ml Essigsäureanhydrid und 1 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt; nach 5 min wurde die Farbintensität gemessen. Das Absorptionsmaximum für Lanosterin liegt bei λ 460 nm, für Ergosterin bei λ 690 nm.

3.4. Dünnschichtchromatographie

Für die weitere Trennung der einzelnen Ätherfraktionen fanden verschiedene Dünnschichtchromatographie-Systeme Verwendung:

a) 0-2%-Ätherfraktion:

Die Abtrennung von Squalen, Lycopersen und Phytoen von den ungesättigteren Carotinoiden erfolgte durch Chromatographie

an Kieselgel-Dünnschichtplatten (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F 254; Merck), die vor Gebrauch 45 min bei 115 °C aktiviert wurden. Das Laufmittel bestand aus einer Lösung von Benzol in Petroläther (Kp. 40-60°C) im Verhältnis 4 : 96. Ungesättigte Kammern (durch zweimaliges Abblasen mit Stickstoff) führten zu einer Erhöhung der R_F -Werte und damit zu einer besseren Trennung; sie bedingten dadurch aber auch eine geringfügige Schwankung der R_F -Werte verschiedener Proben. Die Entwicklungszeit in einer gesättigten Kammer lag bei ca. 60 min, die in einer ungesättigten bei ca. 100 min (verändert nach Graebe, 1968 und Mende, 1976).

Daneben wurden bei einigen Versuchen noch folgende Systeme verwendet:

-- Kieselgel-Platten (nicht aktiviert) mit dem Laufmittel Chloroform : Essigsäureäthylester : Eisessig im Verhältnis 30:70:1 bei Kammersättigung.

-- Aluminiumoxid-Platten (45 min bei 115°C aktiviert) mit dem Laufmittel Benzol in Petroläther im Verhältnis 4:96.

Die entwickelten Platten wurden im sichtbaren Licht (ungesättigtere Carotinoide) markiert, im UV-Licht (254 nm) auf Fluoreszenz geprüft und anschließend Squalen, Lycopersen und Phytoen durch Joddampf sichtbar gemacht.

b) 6 %-bzw. 12 %-Ätherfraktion:

-- Kieselgel-Platten, beschichtet mit einer 4 %igen (v/v) Lösung von Paraffin in Petroläther; Laufmittel : Aceton in Wasser im Verhältnis 13:7 (variiert nach Oster und West, 1968 und Mende, 1976). Das System liefert eine gute Auftrennung für Prenole (siehe Abb.3), während die Sterine am Auftragungsort sitzen bleiben. Nach Entwicklung der Platten wurde deshalb diese Zone eluiert und die darin enthaltenen Substanzen im folgenden System aufgetrennt:

-- Aktivierte Kieselgel-Platten wurden in einem Laufmittel bestehend aus Essigsäureäthylester in Benzol im Verhältnis 1:5 entwickelt (Goad und Goodwin, 1966).

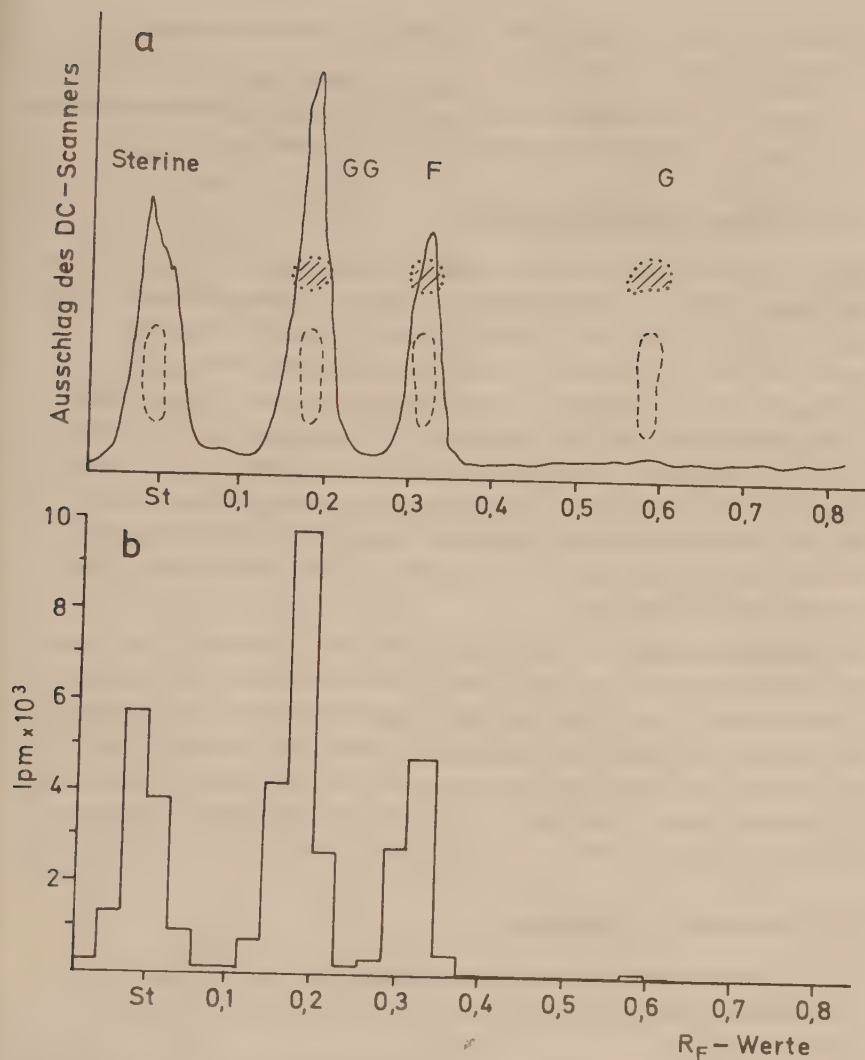


Abb. 3:

Abtrennung der Sterine von Geranylgeraniol (GG), Farnesol (F) und Geraniol (G) durch eine mit Paraffin beschichtete Kieselgel-Platte; Laufmittel Aceton/ H_2O 13:7.

a) Lokalisierung der Radioaktivität durch einen Dünnschicht-scanner

b) Aktivitätsverteilung ermittelt im Flüssigkeitszintillations-spektrometer nach Abschaben des Plattenmaterials.

Die schraffierten Flecken bezeichnen authentische Vergleichssubstanzen.

c) Die Sterine der 100 %-Ätherfraktion wurden ebenfalls in diesem System aufgetrennt.

Die Identifizierung von Phytoen, Sterinen und deren Vorstufen erfolgte mit authentischen Vergleichssubstanzen.

3.5. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität in den einzelnen Substanzen bzw. Substanzgemischen wurde im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Betaszint BF 5000; Fa. Berthold und Friesseke) bestimmt. Als Szintillatorflüssigkeiten diente für wässrige Medien ein Cocktail aus 1 l Dioxan, 100 g Naphthalin und 7 g Butyl-PBD (Zählausbeute 88 %), für organische Lösungsmittel ein Tduol-cocktail folgender Zusammensetzung: 1 l Toluol und 7 g Butyl-PBD (Zählausbeute 96 %); es wurden 0,5 ml Lösung in 10 ml Szintillatorflüssigkeit gemessen. Eine Standardisierung erfolgte durch das Externe-Standard-Kanal-Verhältnis, oder intern mit ^{14}C -Toluol.

Die Lokalisierung der Radioaktivität auf Dünnschichtplatten erfolgte zunächst mit Hilfe des Dünnschichtscanners II mit Autochronschreiber (Fa. Berthold und Friesseke); dann wurden die Platten in einzelne Regionen unterteilt, diese direkt in Szintillationsgläsern abgeschabt und die Radioaktivität im Toluolcocktail bestimmt (variiert nach Graebe, 1968 bzw. Qureshi et al., 1974).

3.6. Verwendete Chemikalien

Die Bezugsquellen für die wesentlichen der verwendeten Chemikalien, die alle von größtmöglicher Reinheit waren, waren folgende:

Boehringer (Mannheim): Antimycin A, ATP, Cytochrom c (Pferdeherz, kristallisiert), NAD(H), NADP (H), PEP, Pyruvat-Kinase, Na-Succinat; Calbiochem (USA): AMO 1618; Lehmann: Hyflo-Super-Cel; Merck (Darmstadt): Aluminiumoxid 90 aktiv-neutral, EDTA (= Ti-triplex), FAD, Gluthation, H_2O_2 ; KF, KCN, L-Malat, Na-Dithionit,

Paraffin DAB 7; Hoffmann- La Roche (Basel): Geranylgeraniol, Lycopersen; Radiochemical Center, Amersham: R,S-(2-¹⁴C)MVA-Lacton; Roth (Karlsruhe): Ergosterin, Geraniol, Farnesol, Lanosterin; Merck-Schuchardt: Squalen, Tween 85; Serva (Heidelberg): Nicotinsäureamid, Triton-X-100; Sigma (USA): DTT (= Dithiothreitol).

III. Ergebnisse

1. Intrazelluläre Lokalisation der Carotinoide

Auf Grund von Literaturangaben wurden Carotinoide bei Pilzen entweder nur in Mitochondrien gefunden, wie bei *Neurospora crassa* und *Phycomyces* (Neupert und Ludwig, 1971; Keyhani et al., 1972) oder in mehreren Organellen und dabei überwiegend in Lipidglobuli, wie bei Sporangio-
phoren aus *Phycomyces* (Zalokar, 1969). Neben den Lipid-
globuli wurde β -Carotin noch zu einem geringen Anteil bei *Mucor hiemalis* in der mitochondrialen und der lös-
lichen Fraktion (Herber, 1974) sowie bei einer Mutante von *Phycomyces* in einer partikulären Fraktion lokalisiert (Riley und Bramley, 1976). Carotinoide könnten aber auch in Plasmamembranen vorliegen, da der Photoreceptor für
Blaulichtreaktionen - wie sie die Carotinoidsynthese dar-
stellt - bei *Neurospora crassa* in einer Plasmamembran an-
genommen (Brain et al., 1977) und ein Carotinoid als hypo-
thetischer Photoreceptor für *N. crassa* noch postuliert wird (De Fabo et al., 1976).

Zunächst sollte daher versucht werden, eine Zellfraktio-
nierung durch differentielle Zentrifugation zu erreichen,
die einzelnen Zellfraktionen durch Aktivitätsbestimmung
von Leitenzymen zu charakterisieren und auf ihre Homogenität
zu überprüfen, sowie ihren Carotinoidgehalt zu bestimmen.

1.1. Differentielle Zentrifugation des Rohextraktes und Charakterisierung der Zellfraktionen

Die Anzucht von *N. crassa* erfolgte nach der in Abschnitt 1., die Induktion der Carotinoidsynthese nach der in Abschnitt 2.1. beschriebenen Weise. Nach Abschluß der Pigmentbildung wurde das Pilzmycel, wie unter Abschnitt 2.2. beschrieben, in einer Reibschale mit Sand homogenisiert. Die Proteinausbeute bei der verwendeten Methode betrug 1 % vom Frischgewicht und 6-7 % vom Trockengewicht.

Nach Abtrennung der ganzen Zellen beziehungsweise Zellbruchstücke konnte der so erhaltene Rohextrakt durch differentielle Zentrifugation entsprechend dem Schema in Abb. 2 weiter fraktioniert werden. Durch die einzelnen Zentrifugationsschritte gelingt eine Auftrennung in verschiedene partikuläre Fraktionen, den Überstand und eine kompakte Lipidschicht. Zur Charakterisierung dieser Fraktionen wurde nun die Aktivität einiger ausgewählter "Leitenzyme" für Zellbestandteile in ihnen bestimmt. In Tab. 1 ist die prozentuale Verteilung dieser typischen Leitenzyme zusammen mit dem Gehalt an Carotinoiden in den einzelnen Fraktionen wiedergegeben. Für eine Identifizierung von Mitochondrien wurde die Fumarase, ein Enzym das in der Mitochondrienmatrix vorliegt, sowie die Cytochrom-c-oxidase und die Antimycin A-insensitive Succinat-Cyt.-c-Reduktase, beides spezifische Marker für die Mitochondrieninnenmembran (Neupert und Ludwig, 1971; Bandlow, 1972; Brain und Briggs, 1976) verwendet. Die Antimycin A-insensitive NADH-Cyt.-c-Reduktase ist neben der Mitochondrienaussenmembran zu einem großen Teil in der Mikrosomalfraktion lokalisiert (Bandlow, 1972; Donaldson et al., 1972; Lord et al., 1973). Die NADPH-Cyt.-c-Reduktase stellt ein Leitenzym für das Endoplasmatische Retikulum (Sottocasa et al., 1967; Lord et al., 1973) und die Katalase ein solches für Microbodies (Theimer und Beevers, 1971) dar.

Betrachtet man zunächst die Verteilung der Enzymaktivitäten, dann ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 1:

Prozentuale Verteilung der Aktivitäten verschiedener Leitenzyme und der Carotinoide in den einzelnen Zellfraktionen nach differentieller Zentrifugation des Rohextraktes.

100 % = Summe der Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen.

I = gesamt, II = ohne Lipidschicht.

Enzym Fraktion	Katalase		Fumarase		Cyt.-c-oxidase		Succinat-Cyt.-c-Red.		NADH-Cyt.-c-Red.		NADPH-Cyt.-c-Red.	Carotinoide	
	I	II	I	II	I	II	I / II	I	II	I	II	I	II
P _{2,3}	1,0	1,1	4,0	4,4	10,7	10,8	1,8	12,4	12,7	1,4	1,6	4,5	10,6
P ₁₃	7,1	8,5	38,9	42,7	63,4	64,1	86,9	23,3	24,0	6,9	7,6	4,2	9,9
P ₂₁	5,2	6,2	4,3	4,7	12,7	12,8	5,3	9,8	10,0	20,4	22,4	9,0	21,4
P ₁₁₅	5,7	6,8	3,6	4,0	7,3	7,4	6,0	28,1	28,8	25,6	28,2	17,9	42,3
ÜB ₁₁₅	64,7	77,4	40,2	44,2	4,8	4,9	0,9	23,9	24,5	36,5	40,2	6,6	15,7
Lipidschicht	16,3	—	9,0	—	1,1	—	0,0	2,5	—	9,2	—	57,8	—

Der Hauptanteil (ca. 80 %) der Aktivität der Katalase, einem Leitenzym für Microbodies, liegt nicht in einer partikulären Fraktion ($P_{2,3}$ und P_{13}) vor, wie für eine "slime"-Mutante von *N. crassa* (Theimer, 1973) gezeigt werden konnte, sondern im Überstand und in der Lipidschicht. Untersuchungen von Kobr et al. (1969) an einem Wildstamm von *N. crassa* ergaben gleichfalls Schwierigkeiten bei der intrazellulären Lokalisation glyoxysomaler Leitenzyme und führten zu einem ähnlich hohen prozentualen Anteil dieser Enzyme im Überstand von $48000 \times g$. Ein Grund dafür könnte eine Zerstörung von Microbodies bei der Homogenisierung mit Sand und ein nachfolgendes Auslaufen der in der Matrix lokalisierten Katalase sein. Das Vorhandensein von Katalase in P_{21} und P_{115} deutet zudem auf eine Tendenz zur Vesikelbildung der Plasmamembranen von *N. crassa* hin (Scarborough, 1975). Darüber hinaus konnte Maxwell et al. (1975) am gleichen Organismus eine enge Nachbarschaft der Microbodies mit dem ER nachweisen. Auch ein Teil der Aktivität der Fumarase (ca. 49 %) sowie der NADH- und NADPH-Cyt.-c-Reduktase findet sich im löslichen Anteil. Mit Ausnahme der Katalase zeigen alle Enzyme in der Lipidschicht nur geringe Aktivitäten. Läßt man die im Überstand und in der Lipidschicht vorhandenen Enzymaktivitäten außer Ansatz, dann ergeben sich für die partikulären Fraktionen die in Abb. 4 dargestellten Verhältnisse. Die Aktivität der Succinat-Cyt.-c-Reduktase findet sich fast ausschließlich in der Fraktion P_{13} , ebenso der überwiegende Anteil der Fumarase und Cytochrom-c-oxidase. Die partikuläre Fraktion P_{13} läßt sich deshalb eindeutig als mitochondriale Fraktion charakterisieren. Die NADH-Cyt.-c-Reduktase ist sowohl in der mitochondrialen Fraktion als auch in einer sogenannten Mikrosomalfraktion (P_{115}), die unter anderem Membranen des Endoplasmatischen Retikulums enthält (Schulze und Staudinger, 1975), vertreten; durch Verlängerung der Zentrifugationsdauer über 60 min hinaus war bei Kotyledonen von Rapskeimlingen (Theimer und Rosnitschek, 1978) nur noch ein geringer Anteil

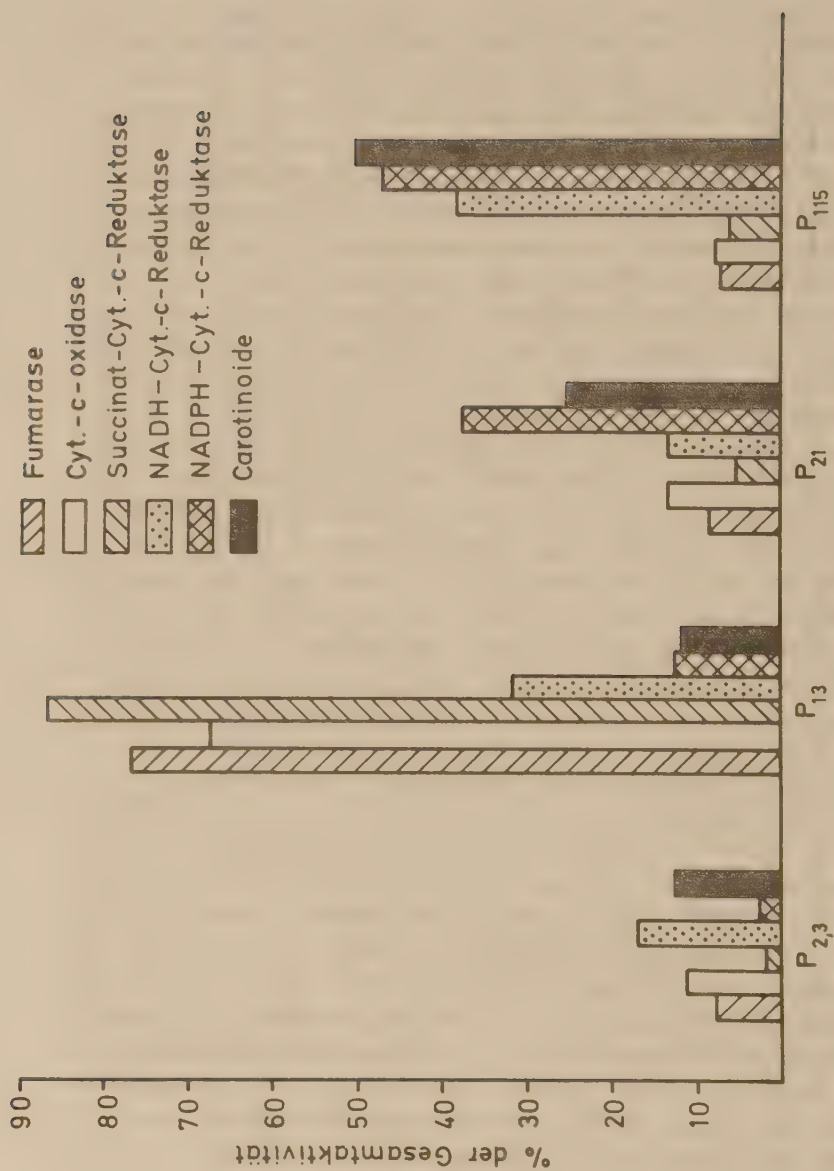


Abb. 4:

Prozentuale Verteilung der Aktivitäten verschiedener Leitenzyme und der Carotinoide in den partikulären Fraktionen nach differentieller Zentrifugation des Rohextraktes.

der im Überstand vorhandenen Aktivität der NADH-Cyt.-c-Reduktase pelletierbar. Die NADPH-Cyt.-c-Reduktase sedimentiert deutlich mit der partikulären Fraktion P_{21} und der Mikrosomalfraktion (P_{115}). Eine partikuläre Fraktion, die nahezu identisch wie P_{21} gewonnen wurde, konnte bei N.crassa von Brain et al. (1977) als "presumptive plasma membrane fraction" charakterisiert werden.

Die Verteilung der Carotinoide (Tab.1) zeigt, daß der Hauptanteil (ca. 58 %) der extrahierten Pigmente in der Lipidschicht vorliegt. Der überwiegende Anteil (ca. 76 %) der in den partikulären Fraktionen wiedergefundenen Carotinoide (Abb.4) sedimentiert mit zwei Membranfraktionen, einer "Plasmamembran"-Fraktion (ca. 25 %), die auch ER enthält, und zu ca. 50 % mit der Mikrosomalfraktion, die durch einen hohen Anteil an Leitenzymen des Endoplasmatischen Retikulums charakterisiert ist. Nur ein geringer Anteil der Carotinoide läßt sich in $P_{2,3}$ beziehungsweise der Mitochondrialfraktion (P_{13}) nachweisen.

Aus Tab. 2 ist die "spezifische" Färbung durch Carotinoide - d.h. der Farbstoffgehalt pro mg Protein - im Rohextrakt und in den einzelnen Fraktionen ersichtlich; im Vergleich dazu sind die spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Leitenzyme und die Proteinverteilung angegeben. Zusammenfassend kann, wie auch Tab. 3 zeigt, aus den Werten geschlossen werden, daß eine Anreicherung der spez. Färbung durch Carotinoide gegenüber dem Rohextrakt durch differentielle Zentrifugation nur in einer "Plasmamembran"-Fraktion, der Mikrosomalfraktion und in der Lipidschicht vorliegen. In P_{21} und P_{115} ist aber auch eine relative Anreicherung der NADPH-Cyt.c-Reduktase im Vergleich zu den anderen partikulären Fraktionen vorhanden. Dagegen ist die Steigerung der spezifischen Aktivität der Succinat-Cyt.c-Reduktase in P_{13} nicht mit einer Zunahme der spezifischen Färbung durch Carotinoide in dieser Fraktion korreliert.

Tabelle 2:

Verteilung von Protein, Carotinoiden und spezifischen Aktivitäten verschiedener Leitenzyme nach differentieller Zentrifugation des Rohextraktes.

Fraktion	Protein [mg]	Carotinoide [$\mu\text{g} \times 10,0$] [mg Prot.]	Spez. Enzymaktivitäten nmol (1) bzw. μmol (2) Substrat verbraucht / min $\times$ mg Protein					
			Katalase (2)	Fumarase (1)	Cyt. - c - oxidase (2)	Succinat-Cyt. -c-Red. (1)	NADH - Cyt. -c-Red. (1)	NADPH-Cyt. -c-Red. (1)
RE	823	3,33	16,9	150,7	289,4	44,3	29,8	16,3
P ₂₃	59	1,28	7,8	176,7	592,5	92,1	20,5	4,8
P ₁₃	63	1,16	9,1	378,7	1109,5	313,0	31,8	5,4
P ₂₁	29	4,45	13,2	107,7	412,2	47,2	34,2	16,1
P ₁₁₅	99	3,47	8,1	54,3	201,5	21,9	32,4	33,7
ÜB ₁₁₅	420	0,34	18,4	135,9	35,8	0,4	11,0	11,6
Lipidschicht	142	6,65	18,9	123,8	31,2	0,0	6,4	10,8

Tabelle 3:

Zunahme der spezifischen Färbung durch Carotinoide bzw. der spezifischen Aktivitäten von Succinat-Cyt.-c-Reduktase und NADPH-Cyt.-c-Reduktase nach Fraktionierung des Rohextraktes durch differentielle Zentrifugation.

Fraktion	Anreicherungsfaktor		
	Carotinoide	Succinat-Cyt.-c-Reduktase	NADPH-Cyt.-c-Reduktase
RE	1	1	1
P _{2,3}	0,38	2,08	0,30
P ₁₃	0,35	7,07	0,33
P ₂₁	1,34	1,07	0,99
P ₁₁₅	1,04	0,49	2,07
ÜB ₁₁₅	0,10	0,01	0,71
Lipidschicht	1,99	0,0	0,66

Aus den bisherigen Ergebnissen (Abb.4, Tab.3) zeigt sich eine Korrelation zwischen dem partikulären Verteilungsmuster der Carotinoide und der NADPH-Cyt.-c-Reduktase. Wenn die Carotinoide an bestimmte Membranfraktionen des Endoplasmatischen Retikulums, die sich durch hohe NADPH-Cyt.-c-Reduktase-Aktivität auszeichnen, gebunden sind, müßte eine Veränderung der Zentrifugationszeit bei $115\ 000 \times g_{av}$ zu einem gleichen Sedimentationsverhalten von Carotinoiden und ER-Leitenzymen führen. Ein Vergleich verschiedener Zentrifugationszeiten in Tab.4 verdeutlicht, daß eine längere Zentrifugationsdauer auch zu einer Zunahme des pelletierbaren Anteils der NADPH-Cyt.-c-Reduktase führt. Die Carotinoide lassen sich durch 60-minütige Zentrifugation zwar zu einem großen Teil aus dem löslichen Überstand entfernen, pelletieren aber nicht wie bestimmte Membranen des Endoplasmatischen

Tabelle 4:

Sedimentierbarkeit der Carotinoide und der NADPH-Cyt.-c-Reduktase bei unterschiedlicher Zentrifugationsdauer bei 115 000 x g_{av}. Die Werte sind in Prozent der Gesamtaktivität angegeben.

Fraktion	Carotinoide		NADPH-Cyt.-c-Red.	
	115 000 x g 30 min	60 min	115 000 x g 30 min	60 min
P _{2,3/10 min}	4,5	4,5	6,8	1,4
P _{13/12 min}	3,3	4,2	6,5	6,9
P _{21/12 min}	-	9,0	-	20,4
P ₁₁₅	40,6	17,9	23,9	25,6
ÜB ₁₁₅	26,5	6,6	44,2	36,5
Lipidschicht	25,1	57,8	18,6	9,2

Retikulum, sondern werden zusätzlich noch aus dieser Membranfraktion herausgelöst und liegen nun konzentriert in einer kompakten Lipidschicht vor. Ebenfalls in Lipidpartikeln konnte der überwiegende Anteil von β -Carotin bei *Mucor hiemalis* (Herber, 1974) und *Phycomyces blakesleanus* (Riley und Bramley, 1976) nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser "Lipidglobuli" bei *Mucor* ließen eine "half-unit-membrane", ähnlich der der Sphärosomen, erkennen. Bei einer "slime"-Mutante von *N.crassa* konnten derartige Sphärosomen identifiziert und ihre offensichtliche Bildung am ER aufgezeigt werden (Wanner, 1977). Weiterhin ließ sich eine altersabhängige Zunahme der Sphärosomen, die mit einer Reduktion des ER zusammenfällt, nachweisen, so daß Sphärosomen möglicherweise als Speicherstrukturen für Lipide des ER dienen. Die Anhäufung

der Carotinoide in der Lipidschicht, die mit zunehmendem Alter beobachtet wurde, bestärkt diese Annahme. Unter der Annahme, daß sich die Lipidschicht beim Wildstamm von *N. crassa* aus Sphärosomen zusammensetzt, könnten diese infolge einer lockeren Assoziation mit Membranen des ER teilweise noch aus partikulären Membranfraktionen herausgewaschen werden.

Ein Vergleich der Absorptionsspektren des Carotinoidgemisches aus verschiedenen Fraktionen sollte Aufschluß über mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Carotinoide in den einzelnen Fraktionen erbringen (Abb.5); während der Rohextrakt nach Lichtinduktion eine typische orangerötliche Färbung aufwies, wie sie sich aus der in vivo-Zusammensetzung der Carotinoide von *N. crassa* nach Abschluß der Pigmentsynthese ergibt (Matzka, 1973), war das mikrosomale Sediment kräftig rötlich, die Lipidschicht dagegen intensiv gelb gefärbt. Die Absorptionsspektren und die daraus resultierende Zusammensetzung der Carotinoide bestätigen die optischen Befunde. Auch eine zusätzliche Auftrennung der Carotinoide der Lipidschicht auf einer Ca(OH)_2 /Hyflo-Super-Cel-Säule (siehe Abschnitt 3.3.) ergab, daß die gesättigteren Carotinoide (ζ -Carotin, γ -Carotin und Neurosporin) überwiegend in der Lipidschicht vorliegen; die Mikrosomalfraktion enthält hauptsächlich ungesättigte Carotinoide wie Lycopin, 3,4-Dehydrolycopin und Neurosporaxanthin.

1.2. Reinigung der partikulären Fraktionen im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten

Nachdem der größte Teil der Carotinoide außer in der "Lipidschicht" in den Membran- oder Mikrosomalfractionen lokalisiert werden konnte, erhebt sich die Frage, ob die Mitochondrien ebenfalls Carotinoidpigmente enthalten. Eine partielle Lokalisation von Carotinoiden in der Mitochondrialfraktion wurde bei *Neurospora crassa* (Neupert und Ludwig, 1971), *Mucor hiemalis* (Herber, 1974), *Phycomyces* (Keyhani et

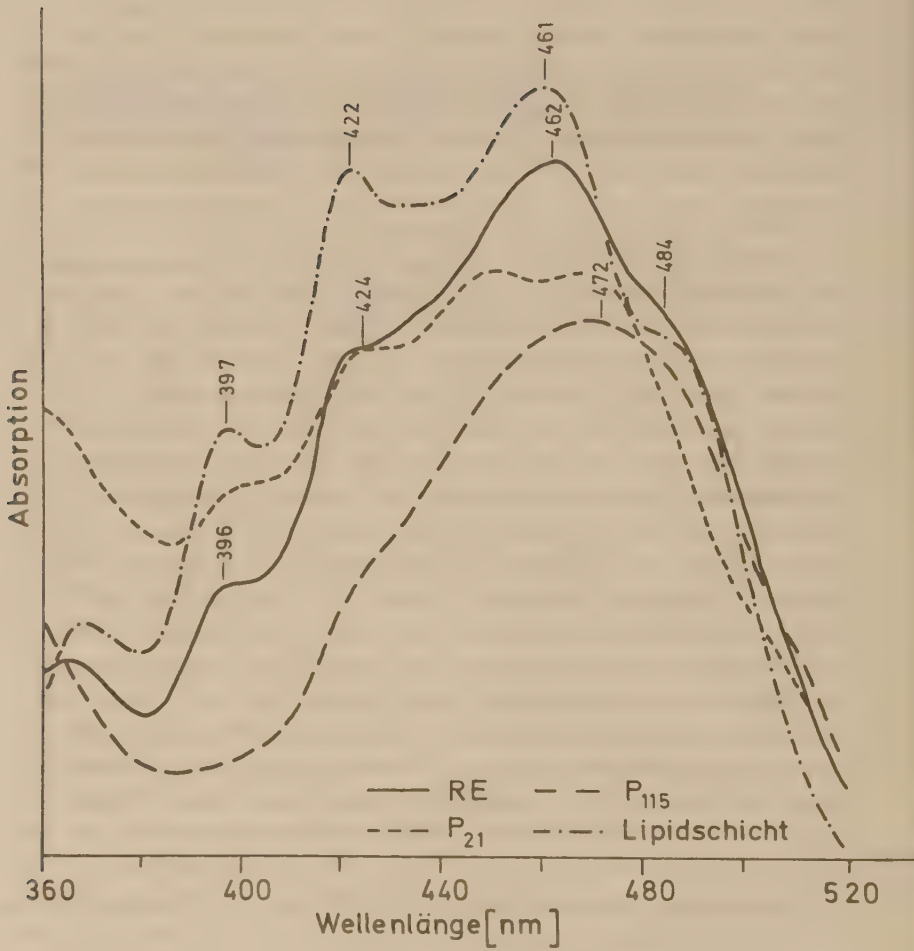


Abb.5:
Absorptionsspektren des Carotinoidgemisches aus
verschiedenen Fraktionen

al., 1972) sowie an nicht plastidiären Zellen von Kartoffelknollen (Costes et al., 1976) gefunden. Da aber nach den vorliegenden Befunden die Mitochondrialfraktion zusätzlich Leitenzyme des ER enthält, beziehungsweise mitochondriale Leitenzyme in der Mikrosomalfraktion vorliegen, läßt sich eine geringe gegenseitige Kontamination dieser Fraktionen nicht ausschließen. Überdies könnte eine Verunreinigung durch Lipidpartikel, die an Organellen adsorbiert oder zwischen sie eingeschlossen durch differentielle Zentrifugation pelletieren, den tatsächlichen Anteil der partikelgebundenen Carotinoide in den Fraktionen verfälschen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde versucht die Mitochondrial-(P₁₃) bzw. Mikrosomalfraktion (P₁₁₅) durch 2,5-stündige Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten weiter zu reinigen; ein diskontinuierlicher Gradient bot gegenüber einem kontinuierlichen Gradienten die Möglichkeit, größere Proteinmengen und somit mehr carotinoidhaltiges Material aufzutragen, ohne zu einer Überladung zu führen.

Aufbau und Zentrifugation des Gradienten erfolgten dabei nach der unter Abschnitt 2.4. beschriebenen Methode, wobei in beiden Gradienten die gleichen Saccharosekonzentrationen verwendet wurden.

In Abb.6 ist die Verteilung der sichtbaren Proteinbanden nach Abschluß der Zentrifugation dargestellt. Sie zeigt, daß in der Mikrosomalfraktion der Hauptteil des Proteins im Bereich der Banden A und B lokalisiert ist, die kräftig orangerot sind und zumindest in Bezug auf die Carotinoide eine Überlappung aufweisen. Daneben treten zwei wenig deutlich ausgeprägte ungefärbte Banden (C und D) auf. In der Mitochondrialfraktion liegen die Banden etwa an entsprechenden Stellen; hier ist die ganz überwiegende Bande (D) nur schwach und die 4 weiteren schwachen Nebenbanden sind ungefärbt.

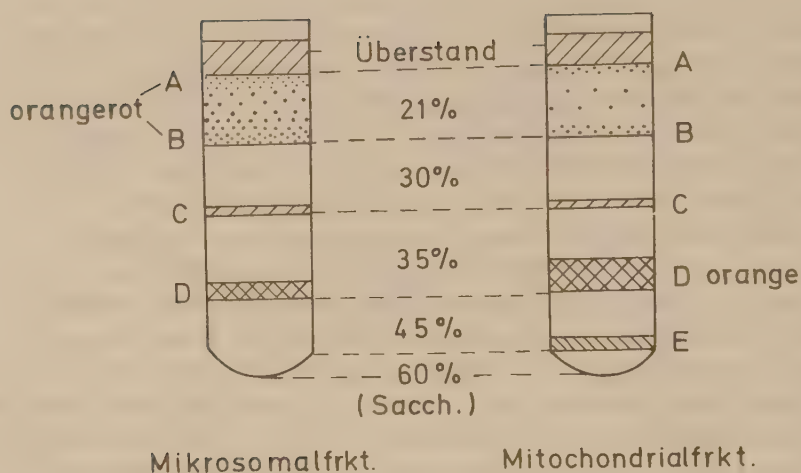


Abb.6:

Verteilung der sichtbaren Proteinbanden nach Zentrifugation der Mitochondrial- bzw. Mikrosomalfraktion im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten.

Zur genaueren Charakterisierung wurden nun die Gradienten fraktioniert und in den einzelnen Fraktionen der Proteingehalt sowie die Aktivität einiger Leitenzyme bestimmt. Der Carotinoidgehalt war so gering, daß für eine hinreichend genaue Bestimmung mehrere Fraktionen aus dem gleichen Gradienten oder Parallelfractionen aus verschiedenen Gradienten vereinigt werden mußten.

Abb.7:

Verteilung von Protein, Carotinoiden und Enzymaktivitäten nach Zentrifugation einer Mikrosomalfraktion (P_{115}) von *Neurospora crassa* im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten. - Der Gradient wurde 2,5 Std. bei einem durchschnittlichen Schwerefeld von $60\ 100 \times g$ zentrifugiert.

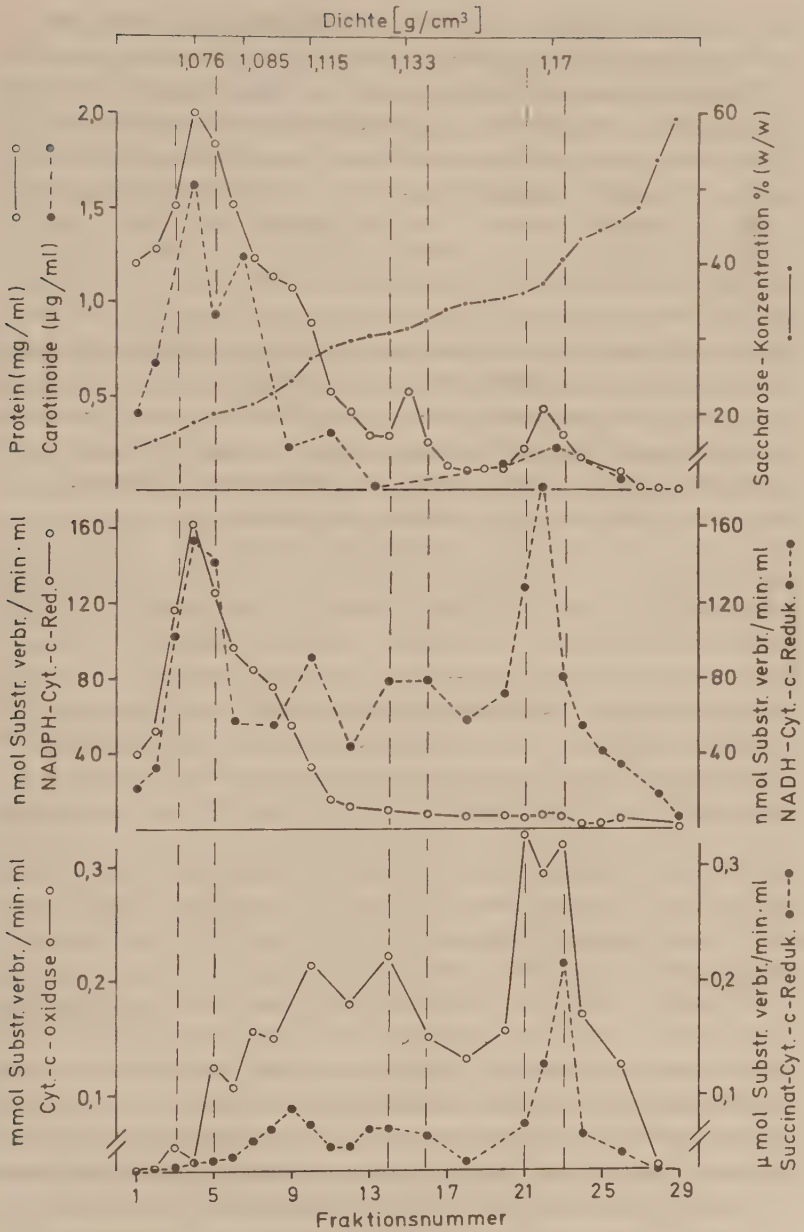


Abb. 7

Das Verteilungsmuster von Protein, Enzymaktivitäten und Carotinoiden der Mikrosomalfraktion (Abb.7) zeigt zunächst in Übereinstimmung mit Abb.6, daß die Hauptmenge des Gesamtproteins (ca. 81 %) in einem breiten Dichtebereich sedimentiert, mit einem Maximum bei einer Schwebedichte von $1,076 \text{ g/cm}^3$. Dieser entspricht den sichtbaren Banden A und B; daneben treten 2 weitere Banden auf, die C und D gleichzusetzen sind.

Mit den Proteinbanden A und B ist in einem Dichtebereich von $1,076 - 1,115 \text{ g/cm}^3$ der weitaus überwiegende Teil der Enzymaktivität der NADPH-Cyt.-c-Reduktase (93 %) und teilweise der NADH-Cyt.-c-Reduktase (45 %) assoziiert, die beide als Leitenzyme für Fraktionen des ER gelten. Übereinstimmend mit der Proteinverteilung erreichen sie ihr Maximum ebenfalls bei einer Schwebedichte von $1,076 \text{ g/cm}^3$.

Eine weitere Proteinbande (D) ließ sich bei einer mittleren Schwebedichte von $1,17 \text{ g/cm}^3$ lokalisieren; sie wird durch Enzymaktivitäten der Cytochrom-c-oxidase und der Succinat-Cyt.-c-Reduktase, die hier ihr Aktivitätsmaximum zeigen und beide Leitenzyme für Mitochondrien sind, charakterisiert. Die Proteinbande (C), die im Dichtebereich von $1,133 \text{ g/cm}^3$ sedimentiert, weist sowohl Enzymaktivitäten des ER als auch der Mitochondrien durch die Succinat-Cyt.-c-Reduktase auf.

Das Verteilungsprofil der Carotinoide der Mikrosomalfraktion läßt eindeutig erkennen, daß diese überwiegend (ca. 85 %) mit verschiedenen Membranfraktionen des ER sedimentieren; eine maximale Färbung durch Carotinoide tritt dabei in zwei sich überlappenden Hauptbanden bei einer Schwebedichte von $1,076$ bzw. $1,085 \text{ g/cm}^3$ auf, sowie zu einem geringeren Anteil bei einer Dichte um $1,12 \text{ g/cm}^3$. In einem Dichtebereich um $1,133 \text{ g/cm}^3$, der der Proteinbande C entspricht und Enzymaktivitäten von Leitenzymen für Mitochondrien und ER aufweist, wurden nur geringe Farbstoffmengen wiedergefunden. Mit einer Mitochondrienbande (C) bei einer Dichte von $1,17 \text{ g/cm}^3$ sind noch ca. 9 % der Carotinoide assoziiert.

Da aber auch die NADH-bzw. NADPH-Cyt.-c-Reduktase hier Aktivität aufweist, läßt sich ein geringer Anteil von ER in dieser Fraktion nicht ausschließen. Im Überstand des Gradienten, der die gelösten Anteile der Mikrosomalfraktion enthält, finden sich dagegen keine nennenswerten Carotinoidmengen.

Vergleicht man nun nach Auftrennung der Mitochondrialfraktion (P_{13}) die Verteilung von Protein, Enzymaktivitäten und Carotinoiden (Abb.8), so zeigt sich auch hier übereinstimmend mit Abb.6, daß die Hauptmenge, d.h. ca. 84 % des Gesamtproteins in einer scharfen Bande bei einer Schwebedichte von $1,181 \text{ g/cm}^3$ sedimentiert, entsprechend der sichtbaren Bande D. Eine Verteilung geringer Proteinmengen in entsprechenden Dichtebereichen wie in Abb. 7 kann den sichtbaren Banden A und B ($1,076 \text{ g/cm}^3$) sowie C (in einem Dichtebereich um $1,133 \text{ g/cm}^3$) zugeordnet werden. Die Nebenbande E läßt sich bei einer mittleren Schwebedichte von $1,216 \text{ g/cm}^3$ lokalisieren.

Koinzident mit der Hauptproteinbande (D) weisen mitochondriale Leitenzyme wie die Cytochrom-c-oxidase und die Succinat-Cyt.-c-Reduktase, die in diese Abbildung nicht zusätzlich eingetragen wurde, ihre maximale Aktivität bei einer Dichte von $1,181 \text{ g/cm}^3$ auf. Eine Membranfraktion des ER kann durch die Enzymaktivität der NADPH-Cyt.-c-Reduktase, die in Übereinstimmung mit Abb. 7 bei einer Schwebedichte von $1,076 \text{ g/cm}^3$ ihr Maximum erreicht, charakterisiert werden; die NADPH-Cyt.-c-Reduktase weist dabei nur ein Zehntel der Aktivität auf im Vergleich zu einer entsprechenden Bande des ER in der Mikrosomalfraktion.

Aus der Verteilung der Carotinoide in der Mitochondrialfraktion geht hervor, daß diese ebenfalls in verschiedenen Dichtebereichen sedimentieren und überwiegend partikulär gebunden vorliegen. Ein Drittel (ca. 34 %) der Carotinoide ist mit einer Fraktion des ER assoziiert, die eine maximale

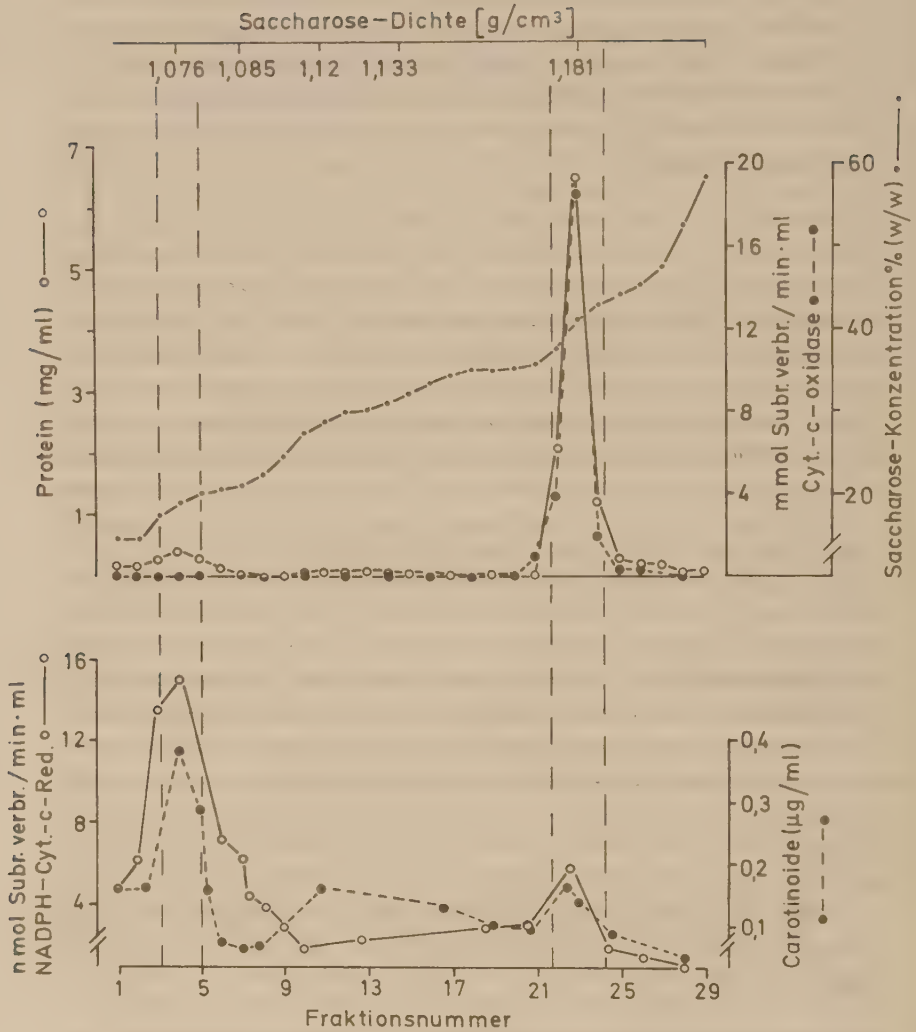


Abb.8:

Verteilung von Protein, Carotinoiden, NADPH-Cyt.-c-Reduktase und Cytochrom-c-oxidase im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten nach Auftrennung einer Mitochondrialfraktion (P_{13}). - Die Zentrifugation erfolgte über 2,5 Std. bei $60\ 100 \times g_{av}$.

Färbung bei einer mittleren Schwebedichte von $1,076 \text{ g/cm}^3$ aufweist, während ungefähr die Hälfte der Carotinoide in Membranfraktionen des Dichtebereichs von $1,12 - 1,133 \text{ g/cm}^3$ wiedergefunden wird. Einer Mitochondrienbande bei einer Dichte von $1,181 \text{ g/cm}^3$ lassen sich knapp 17 % der Carotinoide zuordnen; aber in diesem Dichtebereich liegt auch eine geringe Aktivität eines ER-Leitenzyms vor.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die partikulären Fraktionen P_{13} und P_{115} , die durch differentielle Zentrifugation gewonnen wurden, jeweils aus verschiedenen Fraktionen unterschiedlicher Dichte zusammengesetzt sind. Die Sedimentation mitochondrialer Leitenzyme von *Neurospora crassa* bei einer Dichte von $1,181 \text{ g/cm}^3$ stimmt mit Befunden an *Ricinus endosperm* (Lord et al., 1973) überein. Das Vorkommen geringer NADPH-Cyt.-c-Reduktaseaktivität in diesem Dichtebereich könnte zum einen auf eine geringe Unspezifität des Enzyms, zum anderen aber auch auf eine Kontamination durch das ER zurückzuführen sein. Bei *N. crassa* "slime" treten membranöse Fortsätze der Mitochondrienaußenmembran auf, die als ER gedeutet werden könnten (Wanner, 1977). Derartige Verbindungen zwischen ER und Mitochondrienaußenmembran wurden auch für andere Pilze aufgezeigt (Bracker et al., 1970).

Membranfraktionen des Endoplasmatischen Retikulums mit unterschiedlichem Sedimentationsverhalten wurden bei verschiedenen Pflanzen nachgewiesen und identifiziert: Bei einer Dichte von $1,133 \text{ g/cm}^3$ (Rosnitschek, 1977) und $1,12 \text{ g/cm}^3$ (Lord et al., 1973; Jesaitis et al., 1977; Wardale et al., 1978) durch die NADH- und zum Teil zusätzlich durch die NADPH-Cyt.-c-Reduktase. Darüberhinaus sedimentiert eine leichte Membranfraktion des ER bei einer Dichte von $1,08 (5) \text{ g/cm}^3$ (Lord et al., 1972; Rosnitschek, 1977); bei derselben Dichte konnte auch die äußere Mitochondrienmembran von *Saccharomyces cerevisiae* (Bandlow, 1972) durch die NADH-Cyt.-c-Reduktase lokalisiert werden.

Da eine Mikrosomalfraktion aus verschiedenen Membranfraktionen der Zelle zusammengesetzt sein kann (Morrcé und Mollenhauer, 1974), die einen variierenden Anteil an Proteinen und Lipiden aufweisen, läßt sich auch das unterschiedliche Sedimentationsverhalten im Saccharosedichtegradienten erklären.

Betrachtet man zusammenfassend die bisher erzielten Ergebnisse, dann zeigen sie zunächst, daß der überwiegende Teil, d.h. ca. 60 % der extrahierten Carotinoide nach differentieller Zentrifugation in der Lipidschicht lokalisiert ist. Derartige Lipidpartikel wurden vielfach isoliert und als Carotinoide enthaltende Lipidglobuli (Zalokar, 1969; Herber, 1974; Riley and Bramley, 1976) oder als "Sphärosomen" (Jacks et al., 1967; Wanner, 1977) beschrieben; sie wurden als Speicherstrukturen für Triglyceride bei höheren Pflanzen (Jacks et al., 1967) und bei *Saccharomyces* hauptsächlich für Sterine und Phospholipide (Schaffner, 1974) identifiziert. Die Hauptmenge der restlichen Carotinoide ist mit Fraktionen assoziiert, in denen Zellbestandteile angereichert sind, die sich auf Grund ihrer Schwebedichte und Enzymausstattung als Membranen hauptsächlich des Endoplasmatischen Retikulums charakterisieren lassen. Zur Beurteilung der Frage, ob auch Mitochondrien Carotinoide enthalten, wurde der prozentuale Anteil vom Gesamtfarbstoffgehalt in Teilfraktionen der partikulären Fraktionen P_{13} und P_{115} berechnet und in Tab.5 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß die Carotinoide aus einer partikulären Fraktion, die mit Mitochondrien angereichert ist (Tab.1), nur zu 0,7 % in den intakten Mitochondrien selber lokalisiert sind. Die Carotinoide dieser partikulären Fraktion sedimentieren überwiegend mit Membranfraktionen unterschiedlicher Dichte, die als Fraktionen des ER angesehen werden können. Die Auftrennung der Mikrosomalfraktion führt ebenfalls zu einer Anreicherung der Carotinoide in verschiedenen Membranfraktionen des ER. Damit, daß der Anteil der Gesamtcarotinoide bei einer mittleren Schwebedichte

von $1,181 \text{ g/cm}^3$ in der Mikrosomalfraktion höher ist als in der Mitochondrialfraktion, läßt sich die Vermutung bestärken, daß Teile des ER mit Mitochondrien in Kontakt stehen und mit diesen sedimentieren. Wenn auch für den Wildstamm von *N. crassa* ein postuliertes Endomembransystem gilt und es sich in der Form darstellt wie bei einer "slime"-Zelle von *N. crassa* (Wanner, 1977), wäre ein zeitweiser Kontakt vom ER mit allen Zellorganellen vorhanden. Somit könnten auch in allen partikulären Fraktionen verschiedene Membranbruchstücke des ER auftreten und die äußere Mitochondrienmembran, die von Neupert und Ludwig (1971) bei *N. crassa* als Lokalisationsort für Neurosporaxanthin angegeben wird, wäre nur ein Bestandteil dieses Endomembransystem mit einer bestimmten Dichte.

Tabelle 5:

Prozentualer Anteil vom Gesamtfarbstoffgehalt der partikulären Fraktionen P_{13} und P_{115} in Teilfraktionen verschiedener Dichtebereiche nach Auftrennung in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten.

partikuläre Fraktion	Membranen versch. Dichtebereiche (g/cm^3)				Mitochondr.
	1,076	1,085	1,12	1,133	
P_{13}	1,4		2,1		0,7
$P_{115/60'}$	7,6	6,2	1,6	0,9	1,6

2. Terpenoidsynthesen in einem zellfreien System aus

Neurospora crassa

Auf Grund der bisherigen Befunde stellt sich nun die Frage, ob die Carotinoide in den partikulären Fraktionen und der Lipidschicht, in denen sie lokalisiert sind, auch synthetisiert werden. Als Voraussetzung für die Klärung dieser Frage mußte zunächst versucht werden, aus *N. crassa* ein zellfreies System für die Carotinoidsynthese zu gewinnen.

2.1. Einbau von ^{14}C -MVA in die Terpenoide in vivo

Verschiedene Arbeitsgruppen (Davies et al., 1963; Harding et al., 1969) konnten bei *N. crassa* in vivo einen Einbau von ^{14}C -MVA in die Carotinoide aufzeigen. Als Voraussetzung für weitere Versuche wurde zunächst untersucht, in welchem Umfang der Pilz unter den von uns verwendeten Anzucht- und Regulationsbedingungen ^{14}C -MVA einbaut und welche Substanzen des Terpenoidbiosyntheseweges markiert werden. Um eine möglichst hohe ^{14}C -Markierung der Carotinoide zu erreichen, war ein hoher Einbau in den Gesamtextrakt wünschenswert, da im Mycel der Anteil der Sterine (Tsuda und Tatum, 1961) gegenüber den Carotinoiden (Mitzka und Rau, 1977) um das ca. 20-fache höher ist. Für den Nachweis einer spez. Änderung der Syntheseraten innerhalb der lipophilen Substanzen durch Belichtung, mußten zusätzlich alle Metabolite, die auch im Dunkeln gebildet werden, vor Belichtung ausreichend markiert vorliegen; dies sollte durch eine 2-stündige Vorinkubation erreicht werden.

Methode: Das Mycel wurde nach 2-stündiger Vorinkubation mit ^{14}C -MVA im Dunkeln 30 min belichtet und anschließend wieder im Dunkeln in Waschflaschen (18 ml) bei Zimmertemperatur unter Belüftung belassen. Zu Lichtbeginn und dann zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen.

Zur Extraktion der gebildeten und radioaktiv markierten Substanzen wurde das Pilzmycel von der Versuchslösung abfiltriert, gewaschen und in einem Plastikfläschen (100 ml)

nach Zugabe von je 25 ml Methanol und Aceton mit Glasperlen unter Schütteln (2 mal 30 min) zerschlagen. Das Mycel wurde abgenutscht, nachgewaschen, die gewonnene Extraktionslösung verseift und die Lipide extrahiert (s. Abschn.3.2.). Die Auftrennung des Substanzgemisches erfolgte wie unter Abschn. 3.3. und 3.4. beschrieben.



Abb.9:

Zeitlicher Verlauf des ^{14}C -MVA-Einbaus in die nicht verseifbare lipophile Fraktion nach 2-stündiger Vorinkubation und 30-minütiger Belichtung (Inkubation ohne Glucose). Die zu Beginn der Belichtung schon vorhandene Radioaktivität von 14 785 lpm/mg Trockengewicht wurde von allen Werten abgezogen.

Abb.9 zeigt den zeitlichen Verlauf des ^{14}C -MVA-Einbaus in die nicht verseifbare lipophile Fraktion. Bei einem Einsatz von 2,9 μCi ^{14}C -MVA/Probe entsprechend 30 mg Myceltrockengewicht steigt der ^{14}C -Gesamteinbau zunächst rasch an und

verlangsamt sich nach ca. 3 Std. wesentlich. Nach Rau et al. (1968) ist die Carotinoidbildung von *N.crassa* nach 6-8 Std. beendet. Ein Zusatz von 2 %iger Glucose zum Inkubationsmedium (übliche Versuchsbedingung bei den bisherigen Versuchen zur Photoregulation der Carotinoidsynthese; siehe Mitzka und Rau, 1977) bewirkte eine Erniedrigung des Gesamteinbaus in die nicht verseifbare lipophile Fraktion auf ein Viertel gegenüber der entsprechenden Kontrolle. Durch Vorinkubation waren bei Belichtungsbeginn bereits 14 % vom aktiven ^{14}C -MVA-Isomeren in die nicht verseifbare lipophile Fraktion eingebaut; dieser Wert stieg nach 8 Std. Inkubation auf 37 % an und zeigt damit, daß während der ganzen Versuchszeit genügend Substrat im Außenmedium vorhanden war. Die ^{14}C -Markierung der einzelnen Substanzen ist in Tab.6 dargestellt; zum Vergleich ist zusätzlich die Radioaktivitätsverteilung in Prozent vom Gesamteinbau in die nicht verseifbare lipophile Fraktion aufgeführt. Durch die zugesetzte ^{14}C -MVA lassen sich gut die Carotinoide und die Sterine markieren; der Einbau in Squalen und in die Prenole wie Geraniol, Farnesol und Geranylgeraniol lag weit unter 1 % vom Gesamteinbau.

Aus den Werten läßt sich folgendes entnehmen: Phytoen häuft sich in Dunkelkontrollen von *N.crassa* an und auch ungesättigte Carotinoide werden in geringem Umfang gebildet; dies ist auf eine nicht lichtabhängige Carotinoidsynthese zurückzuführen.

Nach Belichtung erfolgt zunächst eine Erhöhung, dann aber ein Absinken der radioaktiven Markierung von Phytoen, während gleichzeitig die Radioaktivität in den Carotinoiden zunimmt. Drei Stunden nach Lichtbeginn liegen 3,4 % der Gesamtaktivität überwiegend in ξ - und γ -Carotin vor, während ca. 2,7 % in Neurosporin, Lycopin und 3,4-Dehydrolycopin wiedergefunden werden. Darüberhinaus häuft sich Neurosporaxanthin, ein Endprodukt von *N.crassa* an. Eine quantitative Bestimmung des Phytoens nach Abschluß der Pigmentsynthese ergab eine 2,5-fach höhere Phytoenmenge nach Lichtinduktion im Vergleich zur

Tabelle 6:

Zeitlicher Verlauf des ^{14}C -MVA-Einbaus in die Carotinoide (ohne Phytoen), Phytoen, Squalen und die Sterine in Ipm/mg Trockengewicht des Pilzmycels nach 2-stündiger Vorinkubation mit MVA im Dunkeln und anschließender Belichtung (30 min). Danach erfolgte wieder Inkubation im Dunkeln. Prozentangaben in % vom Gesamteinbau.

Zeit nach Beginn der Belichtung	Carotinoide				Phytoen		Squalen		Sterine	
	ohne Phytoen		%		Ipm/mg TGW	%	Ipm/mg TGW	%	Ipm/mg TGW	%
Start	0	Std.	76	0,5	1 162	7,9	60	0,4	11 156	75,5
Licht	1/2	Std.	857	3,6	2 500	10,5	167	0,7	16 618	69,8
	1	Std.	1 507	5,2	1 903	6,5	76	0,3	21 440	73,6
	3	Std.	4 896	13,7	1 678	4,7	30	0,1	23 596	66,0
	8	Std.	5 699	14,4	3 078	7,8	40	0,1	24 615	62,2
Dunkel	8	Std.	1 122	2,8	4 726	11,9	11	0	27 286	68,9

entsprechenden Dunkelkontrolle. Der Phytoenanteil nach Lichtinduktion beträgt bei *N.crassa* 54 % der Gesamtcarotinoide (Mitzka und Rau, 1977).

In Übereinstimmung mit Ergebnissen an dem Pilz *Fusarium aquaeductuum*, der ebenfalls eine obligat lichtabhängige Carotinoidsynthese aufweist (Bindl et al., 1970; Mende, 1976; Jochum, 1977), wird die Sterinsynthese durch Belichtung leicht erniedrigt, was mit einem Abzug von Vorstufen für das Carotinoidsynthese erklärt werden könnte. Durch eine Auftrennung der Sterine konnte nach Co-Chromatographie mit authentischen Vergleichssubstanzen von den 4-Desmethylsterinen das Ergosterin, von den 4,4-Dimethylsterinen Lanosterin und ein geringer Anteil von 4-Monomethylsterinen nachgewiesen werden (Mende, 1976; Jochum, 1977). Eine typische Mengenverteilung ist in Abb. 10 wiedergegeben. Es konnte somit bestätigt werden, daß Ergosterin mit ca. 83 % den Hauptanteil der Sterine von *N.crassa* bildet (Tsuda und Tatum, 1961). Bei Zusatz von Glucose als zusätzlicher C-Quelle war der Einbau in die Sterinvorstufe Squalen sowie in Phytoen gegenüber der entsprechenden Kontrolle erhöht.

Für *Neurospora crassa* wurde somit erneut gezeigt, daß eine partielle Phytoensynthese im Dunkeln abläuft, die betreffenden Enzyme also konstitutiv sind, während ein Teil der Synthese durch Licht zusätzlich induzierbar ist (Zalokar, 1954; Harding et al., 1969; Lansbergen et al., 1976). Es existieren folglich zumindestens zwei photoregulierte Reaktionsschritte: die Phytoensynthese und die Phytoendehydrogenierung und die damit ablaufende Synthese der nachfolgenden ungesättigteren Carotinoide.

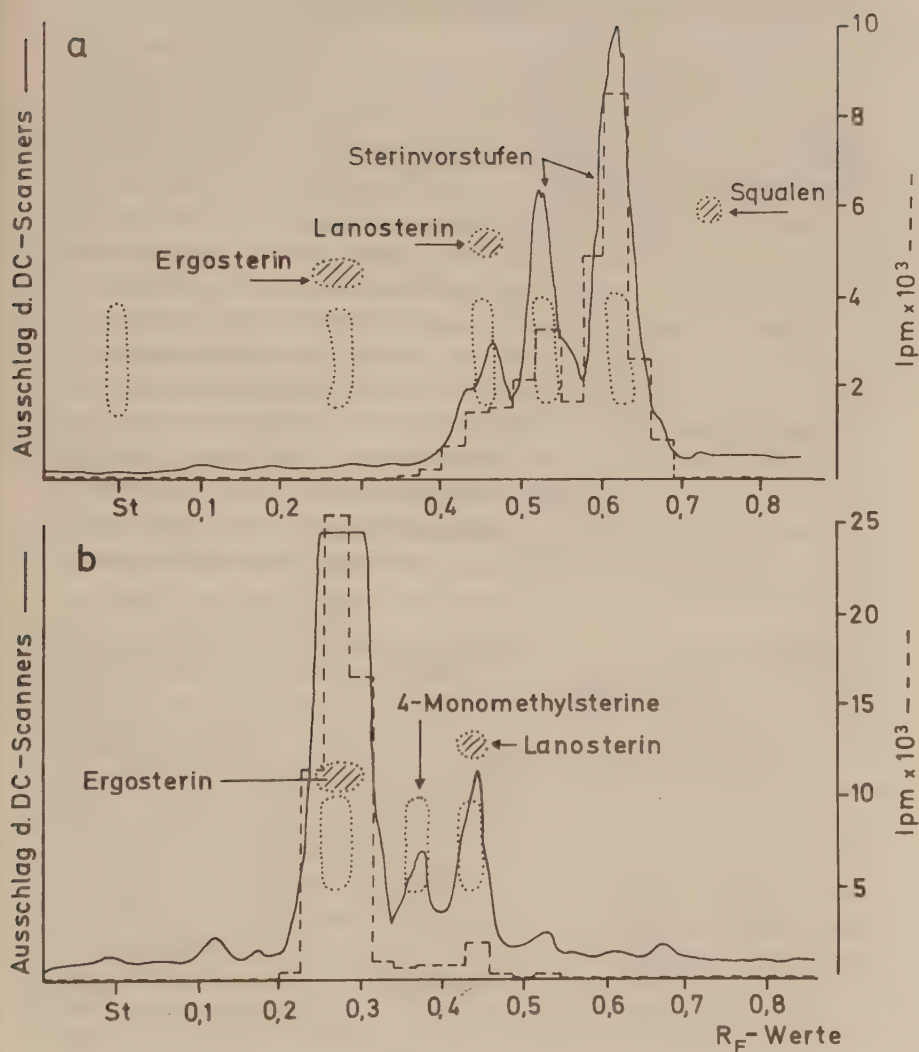


Abb. 10:

Radioaktivitätsverteilung nach dünnsschichtchromatographischer Trennung der Sterine einer a) 6 %- bzw. b) 12 %-Ätherfraktion auf einer Kieselgelplatte; Laufmittel: Essigsäureäthylester/Benzol (1:5). Die schraffierten Flecken bezeichnen authentische Vergleichssubstanzen.

2.2. Ausarbeitung eines zellfreien Systems

In einem zellfreien System aus *N. crassa* sollte ebenfalls ^{14}C -MVA als Substrat angeboten werden. Für eine optimale Einbaurrate dieser markierten Vorstufe in die Carotinoide neben den Sterinen war es deshalb besonders wichtig, die besten Inkubationsbedingungen und Co-Faktoren zu wählen. Aus der Literatur liegen dazu Angaben über pH-Werte und Co-Faktoren vor. Während die pH-Optima für MVA-Kinasen aus Pflanzen von pH 5,5-8,0 variieren (Rogers et al., 1966a; Potty und Bruemmer, 1970; Gray und Kekwick, 1972; Shewry und Stobart, 1973), ist bei den bisher untersuchten Bakterien und Pilzen für die Biosynthese von Phytoen bzw. den ungesättigteren Carotinoiden der pH-Optimumsbereich zwischen pH 7,8-8,0 für Tris-HCl-Puffer. Es besteht also offensichtlich ein breiter wirksamer pH-Bereich; ähnliche Befunde lieferte auch ein stark angereichertes phytoensynthetisierendes Enzymsystem aus Tomatenplastiden (Maudinas et al., 1977).

Vom MVA ausgehend ist im Biosyntheseweg bis zum GGPP neben den betreffenden Enzymen nur ATP und Mg^{2+} oder Mn^{2+} erforderlich. Für die Synthese von Phytoen wird Mn^{2+} teilweise als unabdingbar angenommen (Suzue, 1962; Graebe, 1968; Maudinas et al., 1977), während durch Mg^{2+} , FAD und NADP die Umwandlung von Phytoen zu den ungesättigteren Carotinoiden ermöglicht (Kushwaha et al., 1976) oder zumindestens gesteigert werden soll (Qureshi et al., 1974; Maudinas et al., 1977). Bei den einzelnen Dehydrierungsschritten könnte auch Sauerstoff als Elektronenakzeptor eine Rolle spielen. Für die Biosynthese der Sterine ist neben ATP, Mg^{2+} oder Mn^{2+} , Sauerstoff und NAD(P)H unabdingbar (Lit.s.Grunwald, 1975).

2.2.1. Versuchsansatz zur Induktion carotinoidbildender Enzyme im Mycel und Herstellung eines Zellextraktes

Nach zahlreichen Vorversuchen gelang es schließlich, ein zellfreies System zu gewinnen, in dem bei Zusatz von ^{14}C -MVA die betreffenden Substanzen des Isoprenoidbiosyntheseweges ausreichend hoch markiert wurden. Die nachfolgenden Arbeitsgänge erwiesen sich dabei als optimal:

Das Pilzmycel wurde zunächst vom Nährboden abgenutscht und zur Induktion der carotinoidbildenden Enzyme nach der in Abschn.2.1. beschriebenen Weise in Puffer-Glucose-Lösung 30 min mit 16 000 Lux belichtet; danach erfolgte die Enzymsynthese im Dunkeln. Die unbelichteten Kontrollen blieben während der gesamten Zeit auf einer Schüttelmaschine im Dunkeln bei 22°C in 1 l Fernbachkolben, die mit 400 ml Mycel in Puffer-Glucose-Lösung gefüllt waren.

Das Pilzmycel wurde 2-3 Stunden nach Lichtbeginn zur Herstellung eines Zellextraktes verwendet (s.Abschn.2.2.); dazu wurde das Mycel von der Puffer-Glucose-Lösung abfiltriert, 5 mal gewaschen (dest.Wasser und Extraktionsmedium) und in einem 1,5-fachen Volumen an eiskaltem 0,2 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), der 0,2 M an Nicotinsäureamid und 0,002 M an Gluthation war (Yokoyama et al., 1962), aufgenommen; anschließend wurde in einer Reibschale mit nachgereinigtem Sand (5 g pro 20 g Frischgewicht) 8 min lang homogenisiert, das Homogenat durch Gaze (2-fach) gepreßt und nachfolgend 20 min bei $700 \times g_{av}$ in "swing out"-Bechern zentrifugiert. Der resultierende Überstand war dabei frei von Sporen. In einigen Fällen wurde er zusätzlich über ein Membranfilter (Sartorius) mit einer Porengröße von 3μ oder über Glasfibrerfilter (Whatman, GF/C)filtriert; dadurch ließen sich nicht quantitativ sedimentierte Sporen absondern. Der so erhaltene Rohextrakt wurde ohne weitere Reinigung als Enzymlösung zur Inkubation verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte dabei nach Lowry bzw. durch Fällung mit 10 % TCA (s.Methode Abschn.2.5.2.).

2.2.2. Inkubation des zellfreien Systems

Ausgehend von den Konzentrationen bestimmter Co-Faktoren, wie sie von Yokoyama et al. (1962) verwendet und im wesentlichen von Mende (1976) übernommen wurden, wurde dann auf Grund zahlreicher Vorversuche ein Inkubationsgemisch folgender Zusammensetzung ausgearbeitet (Endvolumen 7,5 ml):

Substanz	Stoffmenge (μ mole)	Vol. (ml)	Konzentration (mmol/l)
Enzymlösung		6,95	
DTT	93,75	0,05	12,5
ATP	37,5	0,05	5,0
MgCl ₂	140,65	0,05	18,8
NAD/NADP	} je 2,8	je 0,05	0,373
NADH/NADPH			
MnCl ₂	9,5	0,05	1,3
FAD	1,4	0,05	0,2

¹⁴ C-MVA	1,25 μ Ci	0,10	0,015

Das Inkubationsgemisch wurde in Gaswaschflaschen (Volumen 18 ml) gefüllt, mit gefilterter Luft gleichmäßig schwach belüftet und im Wasserbad bei 25°C unter Zimmerbeleuchtung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ¹⁴C-MVA gestartet und nach entsprechender Reaktionsdauer durch Zusatz von je 5 ml Äthanol und Aceton beendet.

Die wässrigen Extrakte wurden entweder sofort verseift (Abschnitt 3.2.) oder unter Stickstoff bei -20°C aufbewahrt. Die Extraktion der nicht verseifbaren lipophilen Fraktionen erfolgte nach Abschn.3.2., die Auftrennung des Substanzgemisches nach der in Abschn.3.3. und 3.4. beschriebenen Weise.

2.2.3. Einfluß verschiedener Faktoren auf den ^{14}C -Einbau

Für eine Optimierung dieses zellfreien Systems wurde der Einfluß zusätzlicher Faktoren, wie Mycelalter, Syntheszeit carotinoidbildender Enzyme im Mycel und Proteinkonzentration auf den ^{14}C -MVA-Einbau in die nicht verseifbare lipophile Fraktion untersucht.

Da Änderungen der Enzymausstattung bzw. Syntheseleistung in Abhängigkeit vom physiologischen Alter eines Organismus vielfach beobachtet wurden, stellte sich die Frage, inwieweit das Alter des verwendeten Mycels einen Einfluß auf die Aktivität des zellfreien Systems hat. Eine erhöhte Carotinoidsynthese bezogen auf das Trockengewicht, wie sie bei jungem Mycel auftritt, könnte auf eine vermehrte Induzierbarkeit carotinoidbildender Enzyme zurückzuführen sein. Bei einer 3-stündigen Inkubation von einem zellfreien Extrakt aus 12, 22 und 36 Std. altem belichteten Mycel erbrachte ein 22 Std. altes Mycel bei gleicher Proteinkonzentration (3,1 mg/ml) den höchsten ^{14}C -Gesamteinbau in die nicht verseifbare lipophile Fraktion. Eine Verdopplung der eingesetzten Proteinmenge führte zu einer drastischen Verminderung des Einbaus. Eine lineare Abhängigkeit des ^{14}C -MVA-Einbaus von der Proteinkonzentration war nicht unbedingt zu erwarten, da bei einem heterogenen Enzymextrakt mit einem hohen prozentualen Anteil an Fremdprotein dieses einen konzentrationsabhängigen Einfluß z.B. in Form der Phosphatasen auf den Gesamteinbau haben könnte. Da keine Substratlimitierung durch ^{14}C -MVA vorlag, stellte sich die Frage, ob der Gesamteinbau von Radioaktivität durch eine weitere Reduzierung der eingesetzten Proteinmenge erhöht werden kann. Aus Tab. 7 ist ersichtlich, daß der spez. Einbau durch eine Verringerung der Proteinkonzentration zwar zunimmt, der ^{14}C -Gesamteinbau aber gleichzeitig so stark sinkt, daß die Markierung einzelner Substanzen so gering werden könnte, daß sie in die Nähe der Nachweisgrenze

kommt. Eine Proteinkonzentration von ca. 3 mg/ml erwies sich nach Auftrennung der nicht verseifbaren lipophilen Fraktion als optimaler Kompromiß.

Tabelle 7:

Einbau von ^{14}C -MVA in die nicht verseifbare lipophile Fraktion in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration. Herstellung des Extraktes 3 Std. nach Lichtinduktion.

Enzymlösung (mg Prot./ml)	0,8	1,5	3,1	6,1
Gesamteinbau (Ipm)	77 490	134 700	197 520	137 260
spez.Einbau (Ipm/mg Prot.)	13 594	11 815	8 360	2 873

Da der Induktionsmechanismus und die Synthese der carotinoidbildenden Enzyme von *N.crassa* noch ungeklärt ist, man aber wie bei *Fusarium aquaeductuum* (Bindl et al., 1970) eine sequentielle Synthese der einzelnen Carotinoide und damit auch der dafür notwendigen Enzyme annehmen kann, mußte ein geeigneter Zeitpunkt für die Herstellung eines zellfreien Extraktes ermittelt werden, bei dem eine ausreichende Aktivität der entsprechenden Enzyme vorlag.

Läßt man das Pilzmycel verschieden lange nach Lichtinduktion nachreagieren, stellt dann einen Rohextrakt her und inkubiert diesen 3 Std., so weist der ^{14}C -MVA-Einbau in Phytoen eine eindeutige Abhängigkeit von der Synthesedauer des betreffenden Enzyms im Mycel auf (Tab.8). Zusätzlich ergab sich in den zellfreien Systemen, in denen offensichtlich unterschiedliche Anteile von carotinoidbildenden Enzymen vorhanden sind, derselbe Einfluß der Proteinkonzentration auf den ^{14}C -MVA-Einbau wie in Tab.7 gezeigt wurde. Da Phytoen

weiter zu den ungesättigteren Carotinoiden umgewandelt wird und diese Enzyme nach Möglichkeit ebenfalls erfaßt werden sollten, wurde in weiteren Versuchen eine 2-stündige Synthesedauer für die betreffenden Enzyme gewählt.

Tabelle 8:

Der Einfluß der Synthesedauer der carotinoidbildenden Enzyme im Mycel nach Lichtinduktion auf den ^{14}C -MVA-Einbau in einem zellfreien System.

Der Gesamteinbau ist in Ipm, der Einbau in Phytoen in Prozent vom Gesamteinbau und in Ipm/mg Protein angegeben. Zum Vergleich sind die gebildeten Carotinoide/mg Protein angeführt.

Zeit nach Lichtinduktion (Std.)	0,5	1,5	3,0	6,0
Gesamteinbau (Ipm)	232 240	211 120	197 520	191 440
Phytoen: %	18,3	23,5	16,3	10,8
Ipm/mg Prot.	1 992	2 127	1 403	890
Carotinoide (µg/mg Prot.)	0,012	0,188	0,136	0,075

2.2.4. Kinetik des ^{14}C -MVA-Einbaus

Der zeitliche Verlauf des ^{14}C -MVA-Einbaus in die nicht ver-seifbare lipophile Fraktion in einem zellfreien System aus belichtetem bzw. unbelichtetem Mycel ist in Abb.11 dargestellt. Nach 30-minütiger Inkubation sind im Durchschnitt 1,6 %, nach 5 Std. 16,2 % vom eingesetzten aktiven MVA-Isomeren eingebaut; durch eine Inkubation bis zu 17 Std. bleibt dieser Wert nahezu konstant. In den nachfolgenden Versuchen erhöhte sich der ^{14}C -MVA-Einbau durch weitere Optimierung des zell-

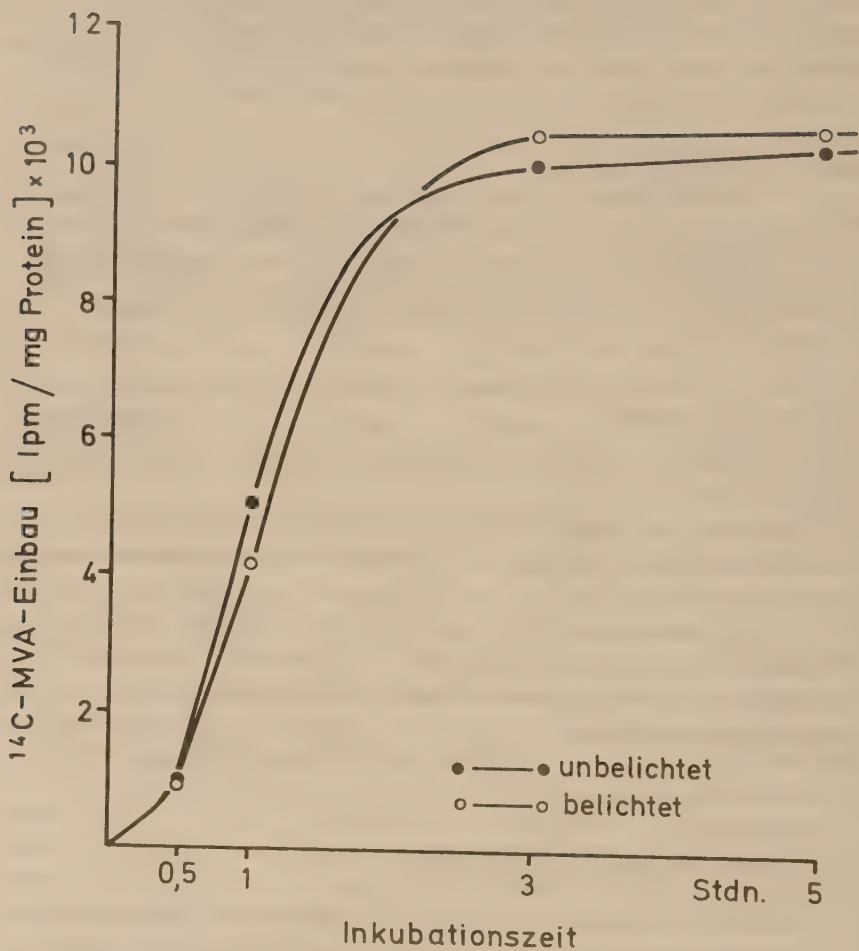


Abb. 11:

Zeitlicher Verlauf des ^{14}C -MVA-Einbaus in die nicht verseifbare lipophile Fraktion in einem zellfreien System aus *Neurospora crassa*. Zellfreie Extrakte wurden aus unbelichtetem bzw. belichtetem Mycel hergestellt.

freien Systems auf durchschnittlich 22 %. Wie aus dem Kurvenverlauf deutlich wird, ist im belichteten wie unbelichteten Mycel der Gesamteinbau nach einer Anlaufphase linear und nach 3 Std. im wesentlichen abgeschlossen. Die Enzyme für den ^{14}C -MVA-Einbau sind also etwa 2 Std. voll aktiv. Die oben angeführten Werte zeigen zudem, daß während der ganzen Zeit, in der das System aktiv ist, genügend Substrat im Außenmedium vorliegt.

2.3. Syntheseleistungen des zellfreien Systems

2.3.1. Biosynthese und Photoregulation einzelner Metabolite des Isoprenoidbiosyntheseweges

Um Aussagen über die Aktivität der einzelnen Enzyme im zellfreien System machen zu können, war zunächst zu klären, welche Substanzen radioaktiv markiert werden. Dazu erfolgte eine Auftrennung der nicht verseifbaren lipophilen Fraktion mit Hilfe einer desaktivierten Aluminiumoxidsäule und anschließend durch Dünnschichtchromatographie und Co-Chromatographie mit authentischen Vergleichssubstanzen (s. Methodik unter Abschn. 3.3. und 3.4.). Die Ergebnisse sind in Tab. 9 und Abb. 12 zusammengefaßt. Der Umsatz von ^{14}C -MVA pro mg Protein schwankte bei Inkubation des Rohextraktes innerhalb der einzelnen Versuche, so daß den jeweiligen Ergebnissen nach 3-stündiger Inkubation (Tab. 9) ein mittlerer Umsatz zugrunde gelegt wurde.

Eine relativ hohe ^{14}C -Markierung konnte in Squalen und den Sterinen, eine geringere in Farnesol und Geranylgeraniol sowie in Phytoen nachgewiesen werden.

Der ^{14}C -MVA-Einbau in die ungesättigteren Carotinoide lag unter 1 % vom Gesamteinbau. Vergleicht man die erzielte radioaktive Markierung mit derjenigen im intakten Mycel (vergl. Tab. 6), dann kann man schließen, daß im zellfreien System die Enzyme für die Sterin- und Phytoensynthese sehr aktiv, die Enzyme, die für die Umwandlung von Phytoen zu den

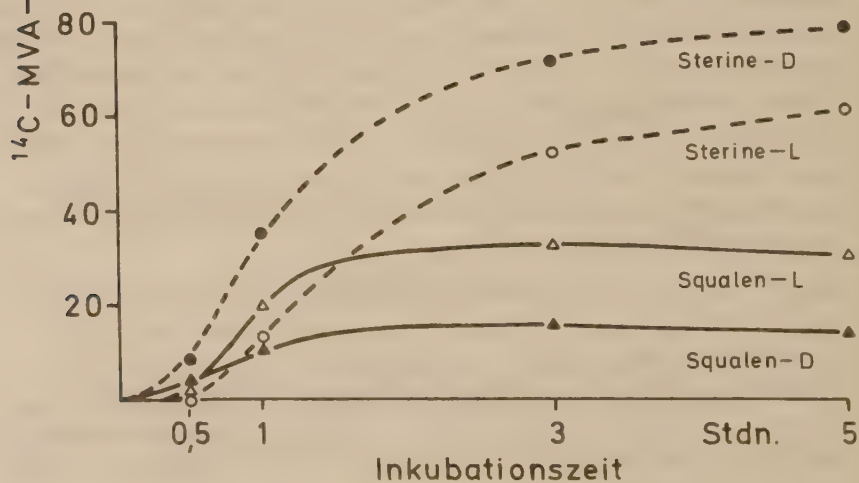
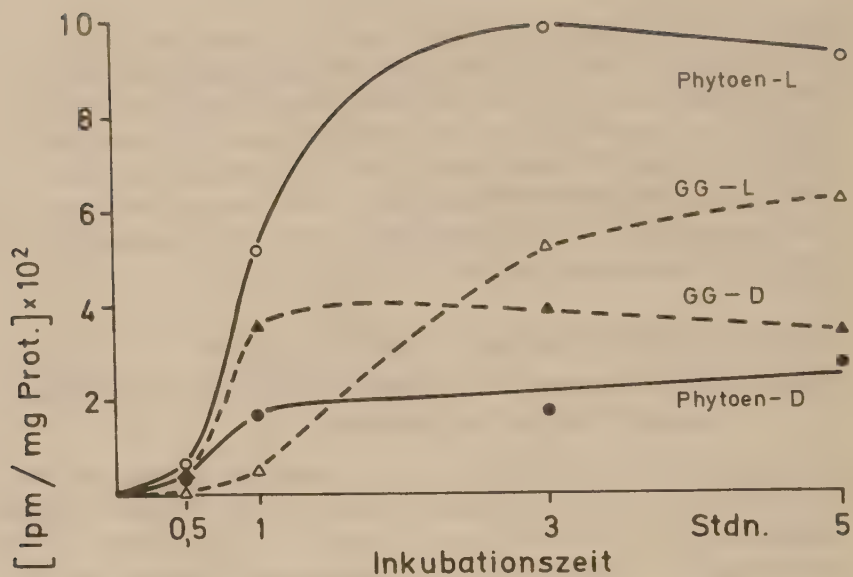


Abb.12:

^{14}C -MVA-Einbau in Phytoen, Geranylgeraniol (GG), Squalen und die Sterine in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
D = zellfreier Extrakt aus unbelichtetem Mycel;
L = zellfreier Extrakt aus belichtetem Mycel.

ungesättigteren Carotinoiden verantwortlich sind, weniger aktiv sind. Auf Grund der Daten sind über die einzelnen Syntheseschritte folgende Aussagen möglich:

Squalen und Sterinbiosynthese: Die Radioaktivitätsverteilung innerhalb der Sterine unterscheidet sich von derjenigen in vivo: Eine Markierung von Ergosterin war erst nach einer 17-stündigen Inkubation nachweisbar, geringe Aktivität lag auch in Lanosterin vor; der überwiegende Teil der Radioaktivität war in Vorstufen der Sterine (Zusammenfassungen: Weete, 1973; Grunwald, 1975), wie in Squalen und den 4-Monomethylsterinen (Abb.10) zu finden. Eine Auftrennung der letzteren unterblieb, weil sie für die Fragestellung der Arbeit nicht von Bedeutung ist. Ebenfalls keinen Einbau in Ergosterin erbrachten in vitro-Versuche an einer ergosterinsynthetisierenden Mutante von *N.crassa* (Bobowski et al., 1977).

Tabelle 9:

Vergleich des ^{14}C -MVA-Einbaus in einzelne Metabolite des Isoprenoidbiosyntheseweges nach 3-stündiger Inkubation von Rohextrakten aus unbelichtetem (D) und belichtetem (L) Mycel.

Substanz		Phytoen	Carotinoide	GG	Farnesol	Squalen	Sterine
Einbau (Ipm)	D	5 268	210	8 218	2 950	47 834	134 651
	L	27 683	2 059	10 982	4 347	74 585	106 615
sp.E. (Ipm/mg Prot.)	D	248	10	388	139	2 256	6 351
	L	1 261	94	500	198	3 398	4 857
% vom Gesamt einbau	D	2,5	0,1	3,9	1,4	22,7	63,9
	L	12,1	0,9	4,8	1,9	32,6	46,6

Die Squalensynthetase verwendet allgemein FPP als Substrat und benötigt als Co-Faktoren NAD(P)H und Mg^{2+} (Zusammenfassung: Grunwald, 1975). Beim Weglassen von NADPH häuft sich als stabiles Zwischenprodukt Präsqalen an (Killing, 1966; Popják et al., 1969). Die Synthese bis zum Squalen verläuft anaerob, die Umwandlung zu den Sterinen erfolgt unter aeroben Bedingungen. Das erste zyklische Produkt bei Pilzen ist Lanosterin (Weete, 1973), das dafür verantwortliche Enzym die 2,3-Oxisqualencyclase (Mercer und Johnson, 1969). Die nachfolgenden Schritte bis zum Ergosterin sind in Bezug auf die zugehörigen Enzyme bei Pilzen noch wenig untersucht.

Die sterinbildenden Enzyme bei *N.crassa* sind konstitutiv, wie aus einem Vergleich zwischen Extrakten aus belichtetem und unbelichtetem Mycel (Abb.12) ersichtlich ist. Nach Belichtung erfolgt dagegen eine vermehrte Synthese von Squalen; so liegen nach 30-minütiger Inkubation in Squalen 57 % der Radioaktivität vor, gegenüber 29 % in der entsprechenden Dunkelkontrolle. Mit zunehmender Inkubationszeit sinkt der prozentuale Anteil beim Squalen während der Einbau in die nachfolgenden Sterinvorstufen zunimmt. Der verminderte ^{14}C -MVA-Einbau in die Sterine in einem Enzymextrakt aus belichtetem Mycel, läßt sich neben einer erhöhten Squalenmarkierung zusätzlich dadurch erklären, daß nach Belichtung bestimmte Vorstufen vermehrt für den Carotinoidbiosyntheseweg benötigt werden; sowohl die Squalen- als auch die GGPP-Synthetase verwenden FPP als Substrat.

Prenolbiosynthese: In vitro konnte eine höhere ^{14}C -Markierung der Prenole erreicht werden als im intakten Mycel. Der Einbau ist jedoch auch hier vergleichsweise gering, vielleicht weil die Umwandlung zu den Sterinen bzw. Carotinoiden sehr rasch erfolgt und sich die Zwischenprodukte somit kaum erfassen lassen. Der prozentuale ^{14}C -Einbau in Geraniol lag unter der Fehlergrenze; in Farnesol stieg er erst mit zunehmender

Inkubationszeit in einem Extrakt aus belichtetem Mycel geringfügig an. Dies könnte auf eine Anhäufung von Vorstufen infolge einer allmählichen Inaktivierung der "späteren" Enzyme zurückzuführen sein. Diese Annahme wird weiter dadurch bestätigt, daß sich GG mit längerer Inkubationszeit in einem Extrakt aus belichtetem Mycel anhäuft. Der prozentuale Anteil dieser Substanz am Gesamteinbau erhöhte sich dabei von 1 % bei 30-minütiger Inkubation auf 6 % nach 8 Std. Inkubation. Bei kürzeren Inkubationszeiten (unter 3 Std.) beruht der geringe Einbau in GG wahrscheinlich auf einem schnellen Abzug von GGPP für die nachfolgenden Syntheseschritte. Ob eine Lichtstimulation der GGPP-Synthetase vorhanden ist, läßt sich deshalb nicht erkennen.

Phytoen- und Carotinoidbiosynthese: In Übereinstimmung mit Befunden von anderen Arbeitsgruppen (Davies et al., 1963 und Goodwin, 1965a) konnte kein radioaktiv markiertes Lycopersen nachgewiesen werden; Phytoen war die erste markierte C_{40} -Verbindung, die zudem in Analogie zu in vivo-Versuchen eine hohe radioaktive Markierung aufwies.

Der Einbau in die ungesättigteren Carotinoide lag unter 1 % vom Gesamteinbau. In den weiteren Versuchen wurde deshalb in erster Linie der Einbau in Phytoen als erster Schritt der Carotinoidbiosynthese untersucht.

Ein Enzymextrakt, bei dem zuvor in vivo die carotinoidsynthetisierenden Enzyme nicht durch Licht induziert worden sind, baut ebenfalls ^{14}C -M VA in Phytoen ein (Abb.12), das entsprechende Enzym ist also teilweise konstitutiv; vergleicht man die Unterschiede im ^{14}C -MVA-Einbau zwischen Extrakten aus induziertem und nicht induziertem Mycel, so läßt sich eindeutig eine zusätzliche Lichtstimulation der Phytoensynthetase zeigen. Die Einbaurate in Phytoen beträgt in den ersten 30 min 14,5 % vom Gesamteinbau, gegenüber 2,6 % im entsprechenden Dunkelwert. Während der prozentuale Einbau

in Phytoen mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt, steigt die Markierung von Phytoen in belichteten Mycelextrakten bis zu 3 Std. an. Durch eine hohe Phytoensynthetaseaktivität wird GGPP und FPP schnell umgesetzt, so daß sich diese Substanzen erst nach 1 Std. im unbelichteten und nach 3 Std. im belichteten Mycel anreichern. Eine Photoregulation der FPP- und GGPP-Synthese läßt sich unter unseren Bedingungen somit nach kurzfristiger Inkubation nicht nachweisen.

2.3.2. Nachweis einer Neusynthese von Enzymen im zellfreien System

Die im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, daß eine Photoregulation der Phytoensynthetase und der nachfolgenden carotinoidbildenden Enzyme bei *N.crassa* auch in vitro nachweisbar ist. Eine Lichtregulation von Enzymen des Carotinoidbiosyntheseweges konnte bisher in vitro nur für die GGPP- bzw. Präphytoensynthetase bei *Mycobacterium* sp. gezeigt werden (Johnson et al., 1974); während die GGPP-Synthetase in Homogenaten von nicht induzierten Zellen vorhanden ist und durch Photoinduktion lediglich gesteigert wird, erwies sich die Präphytoensynthetase bei *Mycobacterium* als vollständig photoinduziert.

Frühere Befunde von Rau et al. (1968) an *N.crassa* haben gezeigt, daß die lichtinduzierte Carotinoidsynthese durch den Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid (CHI) vollständig hemmbar ist, wenn dieser vor der Belichtung appliziert wird. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß durch Photoinduktion die carotinoidbildenden Enzyme de novo synthetisiert werden. Ein direkterer Nachweis einer Neusynthese sollte nun mit Hilfe des Enzymextraktes erbracht werden.

Dazu wurde Cycloheximid in einer Endkonzentration von $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Rau et al., 1968) zu einem Teil des Pilzmycels zugegeben, das Mycel in Puffer-Glucose-Lösung 30 min in Waschflaschen unter Belüftung vorinkubiert und anschließend die

Carotinoidsynthese durch Belichtung (30 min) induziert. Durch Cycloheximid sollte die nachfolgende Proteinsynthese gehemmt und somit eine de novo-Synthese von carotinoidbildenden Enzymen unterdrückt werden (Rilling, 1964; Rau, 1967b; Lit.s. Batra, 1971). Um eine möglichst hohe Phytoensynthetaseaktivität vorzufinden (Tab.8), wurde jeweils 1,5 Std. nach Induktionsbeginn ein zellfreier Extrakt hergestellt und dieser 3 Std. mit ^{14}C -MVA inkubiert.

Tabelle 10:

Vergleich der Synthese einzelner Metabolite in einem zellfreien System aus *N.crassa* nach Zugabe von Cycloheximid (CHI), als Maß für die Enzymneusynthese nach Photoinduktion. Herstellung der Enzymextrakte 1,5 Std. nach Lichtbeginn. Meßdaten in Ipm/mg Protein (spezifischer Einbau) und in Prozent vom Gesamteinbau.
D = Extrakt aus unbelichtetem Mycel,
L = Extrakt aus belichtetem Mycel.

Substanz		Phytoen	Caroti- noide	GG	Farnesol	Squalen	Sterine
D	sp.E.	277	o	1 088	493	2 073	6 517
	%	2,7	o	10,6	4,8	20,2	63,5
L + CHI	sp.E.	226	o	749	267	2 781	6 609
	%	2,2	o	7,3	2,6	27,1	64,4
L	sp.E.	2 620	219	612	796	2 193	4 674
	%	22,7	1,9	5,3	6,9	19,0	40,5

Aus Tab.10 ist zu entnehmen, daß bei Zugabe von Cycloheximid vor der Lichtinduktion der hergestellte Enzymextrakt nur noch zu einer Phytoensynthese befähigt ist, wie sie eine entsprechende Kontrolle ohne Photoinduktion aufweist. Bereits vorhandene konstitutive Enzyme werden durch CHI in ihrer Wirkung nicht wesentlich beeinflusst. Nach Lichtinduktion ist die

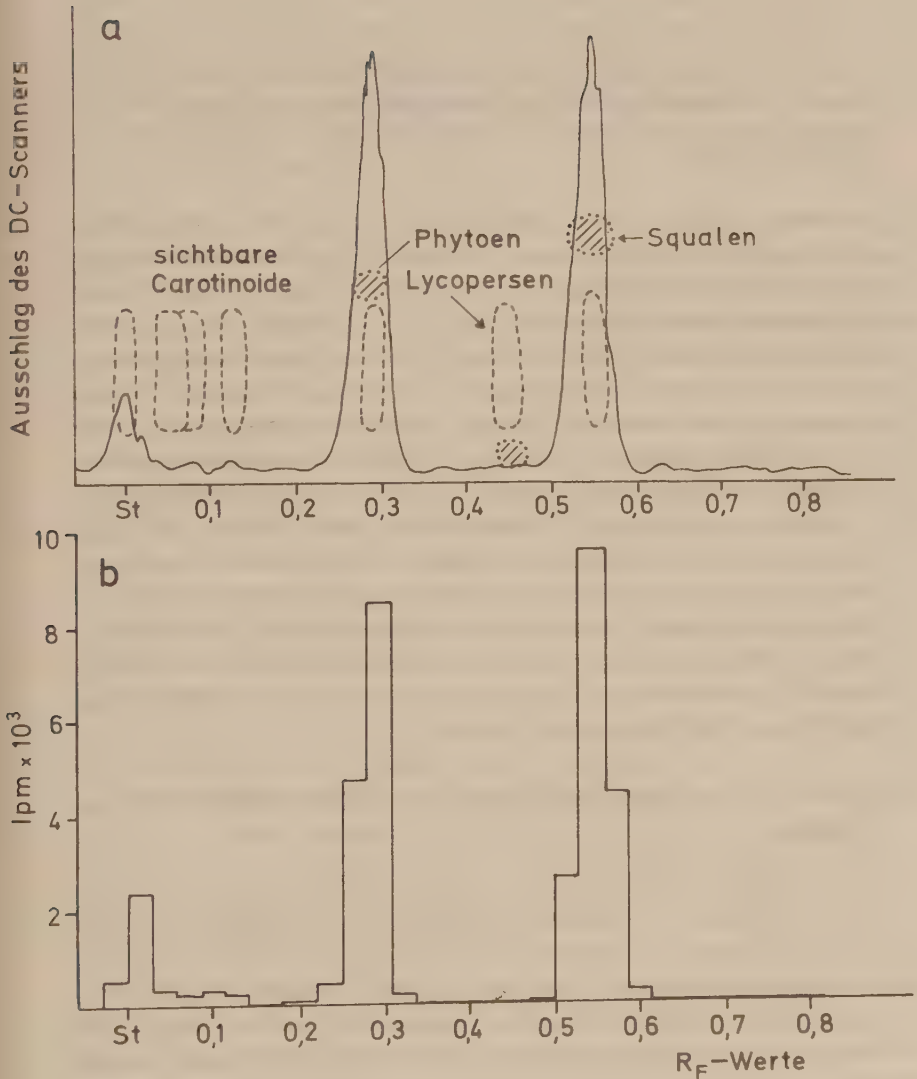


Abb.14:

Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Carotinoiden, Phytoen, Lycopersen und Squalen durch eine Kieselgel-Platte; Laufmittel: Benzol/Petroläther (4:96).

a) Lokalisierung der Radioaktivität durch einen Dünnschichtscanner
b) Aktivitätsverteilung, ermittelt im Flüssigkeitsszintillations-

spektrometer nach Abschaben des Plattenmaterials.
Die schraffierten Flecken bezeichnen authentische Vergleichssubstanzen.

3. Photoregulation der Terpenoidsynthese in einzelnen

Zellfraktionen

In *N. crassa* ist der überwiegende Teil der Carotinoide außer in einer Lipidschicht in einer mutmaßlichen Plasmamembran-(P₂₁), sowie in einer Mikrosomalfraktion (P₁₁₅) lokalisiert (Tab.1); aus diesem Ergebnis ergab sich die Frage, inwieweit die carotinoidhaltigen Fraktionen auch zur Synthese der Carotinoide befähigt sind, oder ob einzelnen von ihnen möglicherweise nur eine Speicherfunktion zukommt. Lipidpartikel selber könnten die Enzymausstattung für die Carotinoide besitzen, oder das ER, das als Syntheseort von Proteinen und Phospholipiden gilt (Lord et al., 1973). Nachdem durch Ausarbeitung eines zellfreien Systems zunächst in einer ungereinigten Enzymlösung aktive Enzyme des Isoprenoidbiosyntheseweges nachgewiesen werden konnten, sollte nun versucht werden zu klären, in welchen Zellfraktionen diese Enzyme lokalisiert sind und inwieweit eine Photoregulation der Synthese der einzelnen Terpenoide nachgewiesen werden kann.

3.1. Lokalisation einzelner Enzyme des Terpenoidbiosyntheseweges

Um eine zelluläre Verteilung von einzelnen Enzymen des Terpenoidbiosyntheseweges nachweisen zu können, wurde zunächst aus dem Mycel 2 Std. nach Photoinduktion ein Enzymrohextrakt (RE) hergestellt (s. Ergebnisse unter Absatz 2.2) und aus diesem anschließend durch differentielle Zentrifugation (entsprechend dem Zentrifugationsschema in Abb.2) verschiedene partikuläre Fraktionen gewonnen. Eine Inkubation dieser Fraktionen mit ¹⁴C-MVA erbrachte jedoch keinen deutlich erkennbaren ¹⁴C-Einbau in die nicht verseifbare lipophile Fraktion. Nun könnten einzelne Sedimente nach Zellfraktionierung zwar carotinoid-

synthetisierende Enzyme enthalten, aber eventuell nicht mehr zur Bildung von ATP befähigt sein und somit das vorliegende ATP-Angebot bereits zum limitierenden Faktor für eine mögliche Biosynthese werden. Um dies zu verhindern, wurde ein ATP regenerierendes System zugegeben, ohne daß jedoch ein höherer ^{14}C -MVA-Einbau erfolgte.

Der Nachweis von aktiven Enzymen des Isoprenoidbiosyntheseweges im Rohextrakt, nicht aber in den Pellets, führte zu der Überlegung, daß nur ein Teil der Enzyme in der Biosynthesekette von MVA ausgehend bis zu den Carotinoiden partikulär gebunden vorliegen könnte, während andere Enzyme löslich sind. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde jeweils ein Teil der fraktionierten Überstände, die sich nach Abtrennung der verschiedenen Sedimente ergaben, 3 Std. mit ^{14}C -MVA inkubiert und nach Extraktion der nicht verseifbaren lipophilen Fraktion die radioaktiv markierten Substanzen aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Überstand inkubiert, der durch eine 2,5-stündige (bisher nur 1-stündige) Zentrifugation bei $115\,000 \times g_{av}$ gewonnen wurde; durch eine Verlängerung der Zentrifugationsdauer sollte ein zusätzliches Sedimentieren sehr leichter Membranen erreicht werden, nachdem der überwiegende Teil der pelletierbaren Carotinoide offensichtlich mit Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, die bei sehr geringer Schwebedichte sedimentieren, assoziiert ist (Abb.7). Der Anteil einer schwach rötlich gefärbten Lipidschicht war gering und ließ sich deshalb nur schwer vom Überstand abtrennen. Dennoch wurde in einigen Versuchen die Lipidschicht abgetrennt und inkubiert.

In Tab.11 ist der ^{14}C -MVA-Einbau in verschiedene Metabolite des Isoprenoidbiosyntheseweges in den fraktionierten Überständen dargestellt. Der Gesamteinbau bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge differierte zwischen den verschiedenen Überständen nicht wesentlich. Der spezifische Einbau in Ipm/mg Protein stellt dabei ein Maß für die Synthesefähigkeit einzelner

Tabelle 11:

^{14}C -MVA-Einbau in einzelne Metabolite in Ipm/mg Protein (spezifischer Einbau) nach 3-stündiger Inkubation. % = Prozent vom Gesamteinbau.

Inkubationsansätze aus einzelnen fraktionierten Überständen.

Die Herstellung zellfreier Extrakte erfolgte aus belichtetem Mycel.

Substanz Fraktion	Phytoen		Carotinoide		G G		Farnesol		Präsqualen + Squalen		Sterine	
	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%
RE	1 324	12,3	1 67	1,6	128	1,2	214	2,0	3 147	29,3	5 160	48,0
ÜB ₁₃	2 240	20,2	4 61	4,1	237	2,1	341	3,1	2 351	21,2	5 092	45,9
ÜB ₂₁	1 642	15,0	88	0,8	192	1,8	391	3,6	4 230	38,7	4 233	38,8
ÜB _{115/} 60 min	1 473	14,6	0	0	312	3,1	533	5,3	6 667	66,1	1 095	10,9
ÜB _{115/} 2,5 Std.	346	3,4	0	0	353	3,5	742	7,4	3 634 4 439	36,0 44,0	398	3,9
Lipidschicht	252	2,5	0	0	313	3,1	454	4,5	545 7 937	5,4 78,7	373	3,7

Substanzen dar. Vergleicht man die Synthesefähigkeit verschiedener Überstände mit der des Rohextraktes, die gleich eins gesetzt wurde, so ergibt sich daraus (Tab.12) eine relative Anreicherung einzelner Enzyme des Terpenoidbiosyntheseweges in den verschiedenen Überständen gegenüber einer ungereinigten Enzymlösung.

Tabelle 12:

Relative "Anreicherung der Synthesefähigkeit" für einzelne Metabolite des Isoprenoidbiosyntheseweges in fraktionierten Überständen gegenüber dem Rohextrakt.
Der spezifische Einbau (Ipm/mg Protein) im Rohextrakt wurde gleich eins gesetzt.

Substanz Fraktion	Phytoen	Caroti- noide	GG	Farnesol	Squalen	Sterine
RE	1	1	1	1	1	1
ÜB ₁₃	1,69	2,76	1,85	1,59	0,75	0,99
ÜB ₂₁	1,24	0,53	1,50	1,83	1,34	0,82
ÜB _{115/60 min}	1,11	0	2,44	2,49	2,12	0,21
ÜB _{115/2,5 Std.}	0,26	0	2,76	3,47	1,41	0,08
Lipidschicht	0,19	0	2,45	2,12	2,52	0,07

Aus Tab.11 und 12 läßt sich zusammenfassend folgendes entnehmen: Der ¹⁴C-MVA-Einbau in die Prenole (Farnesol und Geranylgeraniol) wächst mit zunehmendem Gehalt an löslichem Protein in den einzelnen Überständen. Die Enzyme, die für die Umwandlung von MVA bis GGPP verantwortlich sind, sind also im partikelfreien Überstand (ÜB_{115/2,5 Std.}) angereichert; der spezifische Einbau in Farnesol bzw. in GG steigt dabei um das ca. 3-fache durch Zellfraktionierung an.

Die radioaktive Markierung der Sterine in den einzelnen Überständen sinkt dagegen mit zunehmender Abtrennung von pelletierbarem, partikelgebundenem Protein. Die Enzyme für die Sterinbiosynthese sind demnach in verschiedenen Membranfraktionen lokalisiert, während die Squalensynthetase löslich ist. Im partikelfreien Überstand läßt sich zusätzlich Präsqalen nachweisen.

Die Werte des ^{14}C -MVA-Einbaus in Phytoen und die ungesättigten Carotinoide (Tab.11) zeigen eindeutig, daß die Phytoensynthetase und die nachfolgenden carotinoidbildenden Enzyme ebenso wie die Enzyme der Sterinbiosynthese in partikulären Fraktionen angereichert sind. Die Inkubation eines partikelfreien Überstandes, von dem die Lipidschicht zunächst nicht abgetrennt wurde, erbringt nur noch eine minimale Phytoensynthese; der prozentuale Einbau in Phytoen liegt bei durchschnittlich 3,4 % vom Gesamteinbau. Dieser Wert entspricht etwa einem Einbau in die Sterine in derselben Fraktion. Eine Erhöhung der Zentrifugationszeit auf 2,5 Std. war erforderlich, nachdem ein Überstand, der nach 60-minütiger Zentrifugation im gleichen Schwerfeld gewonnen wurde, zwar keinen ^{14}C -MVA-Einbau in die ungesättigten Carotinoide zeigte, die Phytoensynthese aber noch geringfügig höher als in Rohextrakt war.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Phytoensynthetase und die carotinoidsynthetisierenden Enzyme vor allem an eine "Plasmamembran"-(P_{21}), sowie an eine schwere Mikrosomalfraktion, die Phytoensynthetase darüberhinaus noch an eine leichte Mikrosomalfraktion gebunden sind. Im partikelfreien Überstand liegt nur eine minimale Phytoensynthetaseaktivität vor.

In der Lipidschicht erfolgt kein nachweisbarer ^{14}C -MVA-Einbau in die ungesättigten Carotinoide; darüberhinaus ist sie nur noch in einem sehr geringen Ausmaß zu einer Phytoensynthese befähigt; der Einbau in Phytoen belief sich auf 2,5 % vom Gesamteinbau. Die Squalensynthese dagegen scheint in Lipid-

globuli bevorzugt abzulaufen; der prozentuale Einbau in Squalen liegt bei ca. 79 % vom Gesamteinbau, während nur eine geringe Markierung in Präsqalen vorliegt.

Frühere Ergebnisse, die bei Inkubation einzelner partikulärer Fraktionen keinen ^{14}C -MVA-Einbau in die nicht verseifbare lipophile Fraktion erbracht hatten, lassen sich somit dadurch erklären, daß alle Enzyme, die für die Biosynthese von MVA ausgehend bis zu GGPP benötigt werden, in der löslichen Proteinfraktion vorliegen. Die Umwandlung von GGPP zu den Carotinoiden erfolgt ebenso wie die Synthese der Sterine, die FPP als Substrat benötigt, durch partikelgebundene Enzyme.

3.2. Der lösliche Proteinanteil als Substratquelle für die Phytoensynthetase

Um also das Ausmaß der Terpenoidsynthese in den einzelnen partikulären Fraktionen nach Photoinduktion bestimmen zu können, mußten diesen Prenolpyrophosphate als Substrat geboten werden. Dies sollte zunächst durch Supplementierung mit dem löslichen Proteinanteil versucht werden. Dazu wurden gemeinsame Inkubationsansätze aus jeweils einer Pelletfraktion und dem Überstand gebildet. Durch Zugabe von Kaliumfluorid (0,013 M, entsprechend 100 μmole pro Inkubationsansatz) sollte verhindert werden, daß ein Teil der gebildeten Prenolpyrophosphate durch lösliche Phosphatasen zu Monophosphaten abgebaut wird, und diese somit nicht mehr als Substrat für eine Weitersynthese zur Verfügung stehen. Pilze sind nämlich im Gegensatz zu höheren Pflanzen nicht in der Lage Prenole oder Prenolmonophosphate zu phosphorylieren (Battersby, 1970).

Für den Versuchsansatz wurden die carotinoidebildenden Enzyme im intakten Mycel durch Licht induziert (s. Ergebnisse Abschn. 2.2.1.) und nach Herstellung eines zellfreien Extraktes die einzelnen partikulären Fraktionen durch differentielle Zentrifugation entsprechend Abb. 2 gewonnen; der partikelfreie Überstand wurde im folgenden ohne Abtrennung der Lipidschicht zugesetzt. Das Inkubationsgemisch wies die gleiche Zusammensetzung an Co-Faktoren auf, wie sie unter Absatz 2.2.2. be-

geschrieben ist; neben KF wurde zusätzlich ein ATP regenerierendes System zugegeben. Lösliches und partikulär gebundenes Protein wurde zunächst jeweils im Verhältnis der nach Extraktion festgestellten Proteinprozentsätze zusammengegeben und 3 Std. mit ^{14}C -MVA inkubiert; anschließend erfolgte die Extraktion und Auftrennung der nicht verseifbaren lipophilen Fraktion (s.Methode Abschn.3.2. bis 3.4.).

Auf Grund der Supplementierung mit dem löslichen Proteinanteil konnte nun in den einzelnen pelletierbaren Fraktionen ein deutlicher ^{14}C -MVA-Einbau in Phytoen und die Sterine nachgewiesen werden. Die Phytoensynthese unterschied sich in den verschiedenen Fraktionen jedoch nicht in dem Ausmaß wie man auf Grund der Verteilung der Carotinoide hätte erwarten können. Dies könnte zum einen auf eine annähernd gleiche Synthesefähigkeit aller gebildeten Fraktionen zurückzuführen sein, oder aber auf einen unterschiedlichen Substratmangel. Nach Variation des Proteinverhältnisses zwischen partikulärem und löslichen Anteil ergab sich eine deutliche, für einzelne Fraktionen jedoch unterschiedliche Abhängigkeit des ^{14}C -MVA-Einbaus in Phytoen von der zugesetzten Menge an ÜB₁₁₅.

Um einen Mangel an Prenolpyrophosphaten für einzelne Fraktionen weitgehend auszuschließen, wurde deshalb im folgenden ein 11-fach höherer Anteil von löslichem zu pelletierbarem Protein (entsprechend 16,6 mg Prot./1,5 mg Prot.) zur Inkubation verwendet. Zum Vergleich wurden die ungereinigte Enzymlösung (RE), die pelletierbaren Fraktionen ohne Zusatz löslicher Enzyme und ein rekombiniertes System inkubiert; letzteres setzte sich aus allen Fraktionen einschließlich des partikelfreien Überstandes, entsprechend den ermittelten Proteinprozentsätzen, zusammen. Neben der Synthesefähigkeit der einzelnen Fraktionen sollte eine Photoregulation der Synthese einzelner Metabolite in ihnen näher untersucht werden.

In Tab.13 sind zunächst die Einbauten im Rohextrakt, im rekombinierten System, in vereinigten Pellets und im Überstand miteinander verglichen. Nach Inkubation der ungereinigten Enzym-

Tabelle 13:

¹⁴C-MVA-Einbau in Ipm/mg Protein (= spezifischer Einbau) in die nicht verseifbare lipophile Fraktion (= Gesamteinbau) und in einzelne Metabolite nach 3-stündiger Inkubation. Eingesetzte Proteinmenge ca. 20 mg pro Ansatz. % = Prozent vom Gesamteinbau.
 D = Zellfreier Extrakt aus unbelichtetem Mycel;
 L = Zellfreier Extrakt aus belichtetem Mycel.

Substanz Fraktion	Gesamt-einbau		Phytoen		Carotinoide		G G		Farnesol		Präsqualen + Squalen		Sterine	
	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%
RE	12 662	4,18	3,3	2,0	253	2,0	101	0,8	96	0,8	4 027	31,8	7 572	59,8
	10 747	1324	12,3	1,6	167	1,6	128	1,2	214	2,0	3147	29,3	5160	48,0
rekombiniertes System	12 293	861	7,0	1,2	147	1,2	86	0,7	123	1,0	25 3909	0,2 31,8	6823	55,5
	10 027	2431	24,2	1,0	100	1,0	66	0,7	372	3,7	99 3643	1,0 36,3	3189	31,8
Pellets	39	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ÜB ₁₁₅	313	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L	9 274	37	0,4	1	0	0	130	1,4	232	2,5	7493	0 80,8	1187	12,8
	10085	346	3,4	0	0	0	353	3,5	742	7,4	3634 4439	36,0 44,0	398	3,9

lösung liegt eine ähnliche ^{14}C -Markierung und Photoregulation einzelner Metabolite des Terpenoidsyntheseweges vor, wie in Tab.9 gezeigt wurde. Während die Inkubation der kombinierten partikulären Fraktionen nur zu einem geringfügigen Einbau von ^{14}C -MVA in die nicht verseifbare lipophile Fraktion führt, werden durch den partikelfreien Überstand ^{14}C -markierte Prenole und die Sterinvorstufen Präsqalen und Squalen mit guter Ausbeute synthetisiert, dagegen nur noch wenig Phytoen und Sterine. Fügt man dagegen die einzelnen partikulären Fraktionen wieder mit dem löslichen Protein zusammen (rekombiniertes System), so erhält man eine ^{14}C -Markierung einzelner Metabolite, die der der ungereinigten Enzymlösung entspricht. Die Phytoensynthese ist sogar um das 2-fache gesteigert. Durch das rekombinierte System läßt sich zeigen, daß ein Verlust einzelner Enzymaktivitäten durch die verschiedenen Zentrifugations-schritte nahezu vermieden werden konnte.

Aus einem Vergleich der ^{14}C -Markierung, die nach Inkubation der einzelnen partikulären Fraktionen mit dem löslichen Proteinanteil vorliegt (Tab.14 und Abb.15), mit der in der ungereinigten Enzymlösung und der löslichen Fraktion allein (Tab.13), läßt sich folgendes schließen:

Die Prenole (Farnesol und GG) häufen sich in keiner der partikulären Fraktionen an; ihr prozentualer Anteil am Gesamteinbau bleibt nach Supplementierung mit der löslichen Fraktion unter dem Wert, den ÜB_{115} allein ergibt. Die Enzyme für die Prenolbildung sind nur in der löslichen Fraktion lokalisiert. Eine Zunahme der ^{14}C -Markierung der Prenole nach Belichtung könnte auf eine Photoregulation ihrer Synthese schließen lassen; die stärkere Markierung läßt sich aber auch allein durch die erhöhte Synthese von Carotinoiden und Squalen erklären. Die Sterinvorstufe Squalen häuft sich nur in der partikulären Fraktion $\text{P}_{2,3}$ an; ihr prozentualer Anteil am ^{14}C -Gesamteinbau ist erwartungsgemäß in der löslichen Fraktion hoch, da hier genügend NADPH zur Verfügung steht. In ÜB_{115} sind offensichtlich sterinbildende Enzyme nur zu einem geringen

Tabelle 14:

¹⁴C-MWA-Einbau in einzelne Metabolite in Ipm/mg "pellet"-Protein (= spezifischer Einbau) und in % vom Gesamteinbau in die nicht verseifbare lipophile Fraktion nach 3-stündiger Inkubation. Die Inkubationsansätze bestehen aus einzelnen partikulären Fraktionen kombiniert mit dem löslichen Proteinanteil.

D = Extrakt aus unbelichtetem Mycel; L = Extrakt aus belichtetem Mycel.

Substanz Fraktion	Phytoen		Carotinoide		GG		Farnesol		Präsqalen + Squalen		Sterine		
	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	sp. E.	%	
P _{2,3}	D	652	0,7	19	0,02	486	0,5	1 211	1,3	82 818	0,3	6 707	7,2
	L	15 549	10,5	296	0,2	3 110	2,1	9 033	6,1	108 106	8,9	9 182	6,2
P ₁₃	D	4 050	4,2	96	0,1	1 061	1,1	1 157	1,2	49 275	0,3	41 271	42,8
	L	24 139	16,3	296	0,2	4 147	2,8	7 701	5,2	96 703	9,2	11 995	8,1
P ₂₁	D	10 226	8,8	2 324	2,0	813	0,7	1 278	1,1	19 291	0,1	80 417	69,2
	L	40 818	27,9	1 317	0,9	1 609	1,1	4 682	3,2	43 891	0,9	51 937	35,5
P ₁₁₅	D	5 937	5,3	2 128	1,9	448	0,4	672	0,6	38 309	0,1	61 496	54,9
	L	31 506	20,4	2 471	1,6	618	0,4	4 016	2,6	82 936	0,7	33 668	21,8

Anteil vorhanden oder wenig aktiv. Eine Anreicherung dieser Enzyme läßt sich neben der Mitochondrialfraktion (P_{13}) vor allem in P_{21} und P_{115} , beides Membranfraktionen verschiedener Zusammensetzung, erkennen.

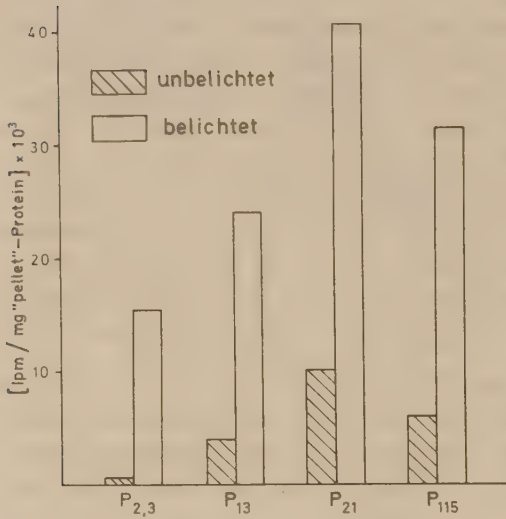


Abb.15:

Vergleich der photo-regulierten Phytylsynthese in einzelnen partikulären Fraktionen nach 3-stündiger Inkubation mit dem löslichen Proteinanteil als Substratquelle.

Zellfreie Extrakte wurden aus unbelichtetem bzw. belichtetem Mycel hergestellt.

Eine ähnliche partikuläre Verteilung weist auch die Phytylsynthetase auf, wobei die Fraktionen $P_{2,3}$ - P_{115} nicht im gleichen Ausmaß zur Synthese von Phytyl befähigt sind. Vor allem P_{21} und P_{115} , aber auch P_{13} zeigen einen erhöhten ^{14}C -MVA-Einbau in Phytyl gegenüber der ungereinigten Enzymlösung. Der prozentuale wie der spezifische Gesamteinbau ist dabei in P_{21} nach Lichtinduktion um ca. das 2-fache erhöht. Darüberhinaus ist eine Photoregulation der Phytylbildung in allen Fraktionen erkennbar; die Phytylsynthese ist nach Photoinduktion drastisch gesteigert.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist aber nur eine Tendenz für eine Anreicherung der Phytylsynthetase und der carotinoidbildenden Enzyme in P_{21} und P_{115} erkennbar. Gesicherte Aussagen

für die letzteren werden dadurch erschwert, daß der Anteil der Carotinoide am ^{14}C -Gesamteinbau gering ist und zudem Schwankungen unterliegt. Es stellte sich daher die Frage, ob eine verminderte Aktivität von carotinoidbildenden Enzymen unter den gewählten Bedingungen vorlag, oder ob der limitierende Schritt in der in vitro-Carotinoidsynthese die vorhandene GGPP-Syntheseaktivität war und somit weiterhin ein Substratmangel vorlag. Um dies zu entscheiden mußte versucht werden, eine bessere Quelle für GGPP zur Supplementierung der partikulären Fraktionen zu finden.

3.3. Das zellfreie System von Cucurbita pepo als Substratquelle für die Phytoensynthetase

Reines GGPP läßt sich biochemisch nur schwierig und unter erheblichem Zeitaufwand darstellen und ist zudem in den meisten daraufhin untersuchten Organismen wie Hefen (Grob et al., 1961), Karottenwurzeln und Schweineleber (Nandi und Porter, 1964) und in *Micrococcus lysodeikticus* (Kandutsch et al., 1964) nur in geringen Mengen vorhanden. Eine hohe GGPP-Synthetaseaktivität fand sich dagegen im Endosperm von unreifen Samen der Cucurbitaceae *Echinocystis macrocarpa* (Oster und West, 1968). Bei der in vitro-Synthese von Kauren durch Enzyme aus dem Samen von *Cucurbita pepo* konnte ebenfalls ein hoher ^{14}C -MVA-Einbau im GGPP erreicht werden (Graebe, 1969); mit Hilfe desselben Systems gelang es auch Mende (1976) eine hohe prozentuale ^{14}C -Markierung von GGPP festzustellen.

3.3.1. Biosynthese von GGPP durch Enzyme aus dem Endosperm von Cucurbita pepo

Die Anzucht der Pflanzen von *Cucurbita pepo* (Kürbis) erfolgte im Botanischen Garten. Aus den nicht voll ausgereiften Früchten wurden die Samen entnommen, an der Spitze abgeschnitten und das halbflüssige Endosperm herausgedrückt. Pro Kürbis konnten dabei durchschnittlich 15-20 ml Endosperm geerntet werden. Dieses wurde sofort bei -20°C eingefroren und so bis zu einem Jahr aufbewahrt. Das aufgetaute Endosperm wurde schonend mit einem Potter-Elvehjem-Gerät homogenisiert und anschließend 20 min

lang bei 35 000 × g zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde nun direkt zur Inkubation eingesetzt; sein natürlicher pH-Wert lag bei 6,5. Dabei fand folgendes Inkubationsmedium nach Graebe (1969), ergänzt nach Mende (1976) Verwendung:

Substanz	Stoffmenge (μmole)	Volumen (ml)
Endosperm		1,5
Pyruvat-Kinase	100 μg	0,01
PEP	2	0,1
MgCl ₂	10	0,05
MnCl ₂	2	0,05
ATP	20	0,1
NADPH	2	0,1

¹⁴ C-MVA	2,5 μCi	0,1

Die Inkubation wurde 3 Std. lang in 15 ml Waschflaschen bei 30°C unter schwacher Belüftung und Zimmerbeleuchtung durchgeführt und die ablaufenden Reaktionen anschließend durch Hinzufügen von 2 ml Aceton beendet. Die wässrigen Extrakte wurden verseift und die nicht verseifbare lipophile Fraktion extrahiert und aufgetrennt (siehe Abschn.3.2. bis 3.4.).

Im zellfreien System aus dem Kürbisendosperm werden aus ¹⁴C-MVA vor allem Kauren und Geranylgeraniol gut markiert, zu einem geringen Anteil auch Squalen und Farnesol. Durch Zusatz von Amo 1618, einem Hemmstoff der Gibberellinsynthese bei Pflanzen, der zusätzlich sowohl die 2,3-Oxisqualencyclase hemmt (Douglas und Paleg, 1972) als auch die Cyclisierung von GGPP zu Kauren (Dennis et al., 1965), erhofften wir eine höhere Anreicherung der Prenole; durch Kaliumfluorid (100 μmole in 0,1 ml) sollten darüberhinaus Phosphatasen gehemmt werden.

Durch den Cyclasehemmstoff Amo 1618 ($2,8 \times 10^{-5} M$) ließ sich zwar die Kaurensynthese drastisch hemmen, zugleich war aber auch der ¹⁴C-MVA-Einbau in die nicht verseifbare lipophile

Fraktion sehr stark herabgesetzt und deshalb wenig befriedigend. Einen Einfluß auf den ^{14}C -Gesamteinbau hatte neben dem jeweiligen verwendeten Endosperm nur die zugesetzte Menge an Amo 1618. Nach Zusatz verschiedener Hemmstoffkonzentrationen war der ^{14}C -Gesamteinbau bei einer Endkonzentration von 10^{-3}M um ca. das 5-fache gegenüber einer Konzentration von $7 \times 10^{-6}\text{M}$ herabgesetzt. Amo 1618 vermag also offenbar die Kaurensynthese nicht vollständig zu hemmen, ohne nicht gleichzeitig auch den ^{14}C -Gesamteinbau drastisch zu verringern. Trotz zahlreicher Variationen konnte keine hohe ^{14}C -Markierung von GG durch das zellfreie System aus dem Kürbisendosperm erreicht werden. Möglicherweise häuft sich GGPP in vitro nicht an und zeigt somit ein ähnliches Verhalten wie im partikelfreien Überstand aus *N. crassa*. Zudem ließ sich GG nach Zugabe von Amo 1618 nicht vollständig extrahieren; ein Teil der radioaktiv markierten Substanz lag noch gebunden im Proteinpräzipitat vor. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Oster und West (1968) an *Echinocystis macrocarpa*. Die Menge an ^{14}C -markiertem GG, die mit Hilfe des Kürbisendosperm-Systems gewonnen wird, ist dennoch gegenüber derjenigen aus der löslichen Fraktion von *N. crassa* deutlich erhöht.

3.3.2. Supplementierung des zellfreien Systems aus *Neurospora crassa* mit dem in vitro-System aus Kürbisendosperm

In den folgenden Versuchen wurde die GGPP-Bildung durch Enzyme aus dem Endosperm von *Cucurbita pepo* als Substratquelle für eine in vitro-Phytoensynthese durch Enzyme aus *N. crassa* verwendet. Dazu wurde ein kombiniertes System aus den zellfreien Extrakten aus *Neurospora crassa* und dem Kürbisendosperm gebildet. Auf Grund der Untersuchungen von Graebe kann man annehmen, daß ein großer Teil der gebildeten Prenole als Pyrophosphate vorliegt, so daß dieses kombinierte System den Zusatz von isoliertem GGPP ersetzt.

Das gemeinsame Inkubationsmedium besaß in einem Endvolumen von 7,5 ml folgende Zusammensetzung:

Substanz	Stoffmenge (μ mole)	Volumen (ml)	Konzentration (mmol/l)
Enzymfraktion aus <i>N.crassa</i>		2,8	
Kürbisendosperm		3,5	
DTT	93,75	0,05	12,5
ATP	37,5	0,05	5,0
MgCl ₂	140,65	0,05	18,8
NAD/NADP	je	je 0,05	0,373
NADH/NADPH			
MnCl ₂	9,5	0,05	1,27
FAD	1,4	0,05	0,19
Tris-HCl 2M, pH 7,8	1000	0,5	133
PEP	1	0,05	0,13
Pyruvate-Kinase	100 μ g	0,01	
KF	100	0,05	13,3
Amo 1618	0,015	0,05	0,002
¹⁴ C-MVA	2,5 μ Ci	0,1	0,03

Die Inkubation erfolgte unter den in Abschn.3.3.1. beschriebenen Bedingungen bei 27°C; die Reaktionen wurden, wie unter Absatz 2.2.2. angegeben ist, beendet; nach der dort geschilderten Methode erfolgten auch alle weiteren Arbeitsschritte.

Vorversuche zeigten, daß im kombinierten System der ¹⁴C-MVA-Einbau in Phytoen gegenüber dem im zellfreien Extrakt allein aus *N.crassa* um das 3-fache erhöht ist. Daraus kann geschlossen werden, daß die Phytoensynthetase aus *Neurospora* GGPP, das durch Endosperm-Enzyme gebildet wurde, zur Weitersynthese verwendet.

Um nun eine unterschiedliche Aktivität von phytoen- und carotoidsynthetisierenden Enzymen in den verschiedenen Fraktionen aus *N.crassa* eindeutig nachweisen zu können, sollte bei Beginn dieser Enzymreaktionen eine möglichst hohe Substratmenge vorliegen; in Abhängigkeit von der Enzymaktivität könnte dann ein unterschiedlicher Substratumsatz pro Zeiteinheit während einer

möglichst kurzen Inkubationszeit in den einzelnen Fraktionen erwartet werden. Enzyme aus dem Endosperm (3,5 ml) von *Cucurbita pepo* wurden deshalb zunächst 2,5 Std. im kompletten Inkubationsgemisch unter Amo 1618 vorinkubiert und anschließend die Phytoensynthese jeweils durch Zugabe der verschiedenen Proteinfractionen aus *N. crassa* (1 mg Protein) gestartet. Eine 10-minütige Enzymreaktion erwies sich dabei im Hinblick auf eine ausreichend hohe Einbaurrate von ^{14}C -markiertem Substrat in Phytoen und vor allem in die Carotinoide als optimal.

Die Ergebnisse sind in Tab.15 und 16 sowie Abb.16 dargestellt. Aus Tab.15 ist zunächst zu entnehmen, daß der spezifische Einbau von ^{14}C -MVA (Gesamteinbau) in die nicht verseifbare lipophile Fraktion in den verschiedenen Proteinfractionen stark differiert. Der höchste Einbau liegt dabei in den Fraktionen P_{21} und P_{115} vor; in einem geringeren Umfang auch in der P_{13} -Fraktion. Die partikuläre Fraktion $P_{2,3}$ und die lösliche Proteinfraction (ÜB_{115}) weisen dagegen nur eine geringe ^{14}C -Gesamtmarkierung auf, die etwa dem ^{14}C -MVA-Einbau in Ipm entspricht, den das zum Vergleich mitgeführte Kürbisendosperm-System allein erbringt.

Betrachtet man die Phytoensynthese in den einzelnen Fraktionen (Tab.15 und Abb.16), so zeigen wiederum die beiden Membranfraktionen P_{21} und P_{115} die höchste spezifische Aktivität; ein geringerer spezifischer Einbau liegt noch in P_{13} vor. Demgegenüber weist die lösliche Proteinfraction nur eine minimale Phytoenbildung auf; ebenso läßt sich in $P_{2,3}$ ^{14}C -markiertes Phytoen nur in geringem Umfang nachweisen. Ein Vergleich der Synthese der Carotinoide, die ebenfalls aus Abb.16 hervorgeht, zeigt in Übereinstimmung mit der Phytoenbildung in der partikulären Fraktion P_{21} eindeutig auch die höchste spezifische Aktivität der carotinoidbildenden Enzyme. Darüberhinaus weisen diese Enzyme, die Phytoen als Substrat verwenden, die gleiche Verteilung der spezifischen Aktivität wie die Phytoensynthetase in den einzelnen Fraktionen auf.

Tabelle 15

Fraktion	Gesamt- einbau (sp.E.)	Davon Einbau (sp.E.) in						
		Phytoen	Carotinoide	GG	Kauren	Farnesol	Squalen	Sterine
P _{2,3}	D	2 021	121	11 508	25 667	381	3 709	2 638
	L	9 725	236	9 428	15 061	533	1 923	2 987
P ₁₃	D	5 923	168	20 656	29 946	493	4 094	4 558
	L	67 246	1 299	11 873	20 075	557	2 913	15 385
P ₂₁	D	17 676	650	38 311	29 230	484	4 073	6 310
	L	226 125	4 649	13 145	19 125	461	3 098	41 473
P ₁₁₅	D	18 787	357	31 716	25 576	423	3 778	7 815
	L	204 939	2 760	11 292	15 871	417	2 990	36 545
ÜB ₁₁₅	D	855	36	12 128	29 376	399	3 596	2 835
	L	1 705	124	7 430	18 800	346	2 372	1 879
Kürbis- endosperm		lpm	lpm	lpm	lpm	lpm	lpm	lpm
	(D)	52 380	230	11 392	31 939	297	3 949	2 811
	(L)	49 400	136	9 258	28 037	457	3 028	2 979

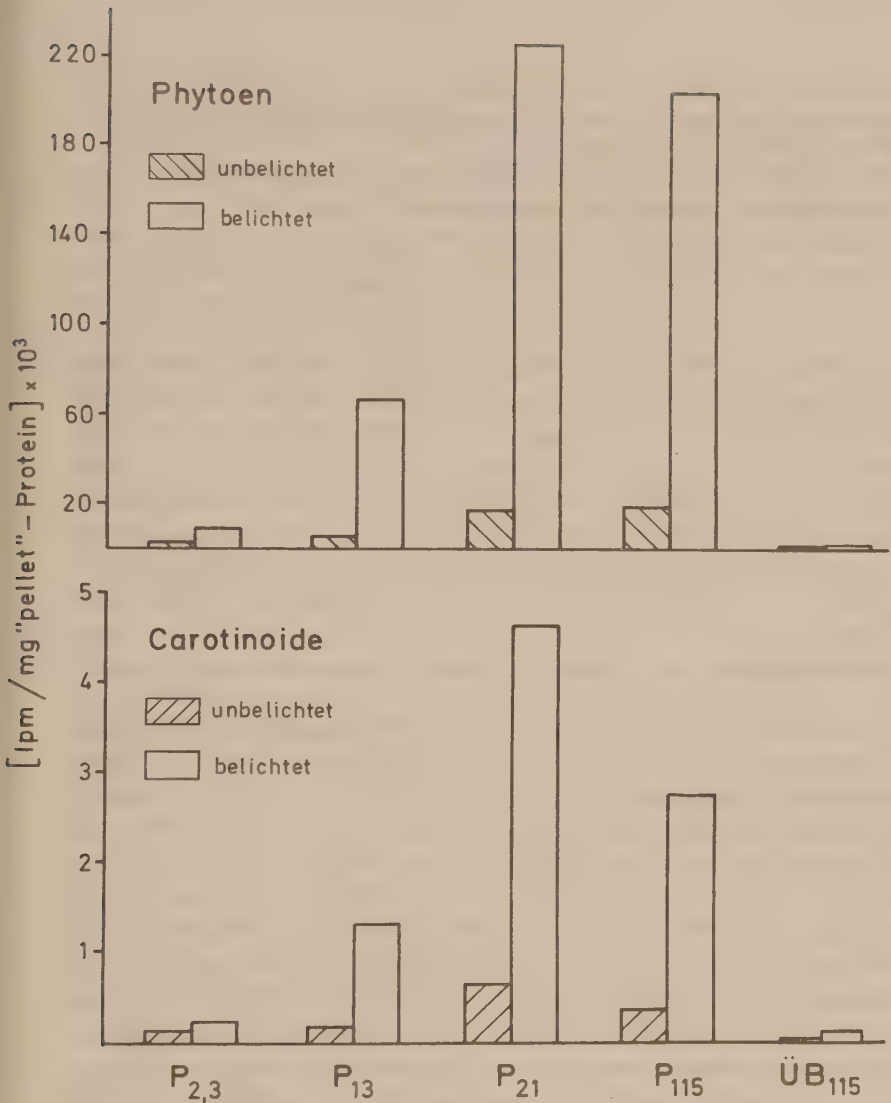


Abb.16:

Vergleich der photoregulierten Synthese (Ipm/mg "N.c."-Protein) von Phytoen und Carotinoiden in einzelnen Zellfraktionen nach 10-min. Enzymreaktion. Zellfreie Extrakte wurden aus unbelichtetem bzw. belichtetem Mycel hergestellt.

Tabelle 15: ^{14}C -MVA-Einbau in Ipm/mg "N.c."-Protein (spez.Einbau) in die nicht verseifbare lipophile Fraktion und in einzelne Metabolite nach 10-min.Enzymreaktion. [Biosynthese von GGPP durch Enzyme aus dem Endosperm von Cucurbita pepo (2,5 Std.Vorinkubation)]. Zusätzlich ist der ^{14}C -Einbau (Ipm) angegeben, der allein durch Enzyme aus dem Kürbisendosperm bewirkt wurde. D (L) = zellfreier Extrakt aus unbelichtetem (belichtetem) Mycel.

Tabelle 16:

Prozentuale Verteilung der Aktivitäten von Enzymen für die Synthese von Phytoen, Carotinoiden und Sterinen in verschiedenen Zellfraktionen aus *N. crassa*.

D = zellfreier Extrakt aus unbelichtetem Mycel,

L = zellfreier Extrakt aus belichtetem Mycel.

Fraktion	% der Gesamtaktivität (= Summe der Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen)					
	"Phytoensynthetase"		carotinoidsynthet. Enzyme		sterinsynth. Enzyme	
	D	L	D	L	D	L
P _{2,3}	2,7	1,4	o	1,0	1,3	o
F ₁₃	11,9	14,6	o	16,8	15,3	16,7
P ₂₁	17,2	23,9	48,7	31,5	13,6	25,0
P ₁₁₅	63,8	58,1	51,3	49,2	67,8	58,3
ÜB ₁₁₅	4,4	2,0	o	1,5	2,0	o

Die "vermutliche Plasmamembran-Fraktion" P₂₁ besitzt zwar die höchste spezifische Aktivität für die Phytoen- und Carotinoidsynthese. Da die P₁₁₅-Fraktion aber sehr viel mehr Protein enthält, liegt bei der prozentualen Verteilung der Gesamtaktivität der Enzyme in den einzelnen Fraktionen (Tab.16) der Hauptteil der Aktivitäten, entsprechend ca. 60 % der Phytoensynthetase und etwa 50 % der carotinoidbildenden Enzyme, in der Mikrosomalfraktion F₁₁₅ vor. Daneben befindet sich noch ein größerer Anteil der Phytoensynthetase sowie der carotinoidbildenden Enzyme in der P₂₁-Fraktion. In den beiden Membranfraktionen P₂₁ und F₁₁₅ liegen ca. 80 % der Enzymaktivitäten für die Phytoen- und Carotinoidbildung vor. Carotinoidsynthetisierende Enzyme zeigen in Extrakten aus unbelichtetem Mycel einzig in diesen beiden Fraktionen Enzymaktivitäten, wenn man jeweils eine Radioaktivitätsverunreinigung, wie sie sich nach Inkubation im Hürbis allein ergibt, abzieht. In der löslichen Proteinfraction einschließlich der Lipidschicht (ÜB₁₁₅), aus der der überwiegende Teil (ca. 64 %) der Carotinoide nach Abschluß der

Pigmentsynthese extrahiert wurde, läßt sich dagegen nur ein minimaler Anteil der jeweiligen Enzyme nachweisen.

Die sterinbildenden Enzyme zeigen die gleiche Verteilung wie die phytoen- und carotinoidbildenden Enzyme; der weitaus überwiegende Teil (ca. 82 %) liegt in P_{21} und P_{115} vor. Die Mikrosomalfraktion P_{115} weist auch hier den höchsten Anteil der Enzymaktivitäten auf.

Durch Enzyme aus dem Kürbisendosperm allein werden unter Amo 1618 vor allem Kauren und GG gebildet (Tab.15); letzteres häuft sich nicht an. Der prozentuale Anteil von GG am ^{14}C -Gesamteinbau beträgt ca. 20 %, der von Kauren ca. 60 %. In geringem Umfang erfolgt auch die Synthese von Squalen und Sterinen. Der Anteil von Farnesol am ^{14}C -Gesamteinbau beträgt nur etwa 1 %. Die Radioaktivität (in Ipm), die nach dünnschichtchromatographischer Trennung im Bereich von Phytoen und Carotinoiden ermittelt wurde, beruht auf Verunreinigungen, da diese Substanzen durch Enzyme aus Cucurbita pepo nicht synthetisiert werden (Graebe, 1969). Eine Synthese von Substanzen die allein durch partikelgebundene Enzyme aus N.crassa hervorgerufen wird, ergibt sich aus einem Vergleich zwischen dem Kürbisendosperm-System allein und den verschiedenen kombinierten Systemen. Dieser Vergleich zeigt, daß durch partikelgebundene Enzyme aus Neurospora crassa nur Sterine, Phytoen und Carotinoide gebildet werden; der ^{14}C -MVA-Einbau in diese Substanzen ist nach einer 10-minütigen Inkubationszeit drastisch erhöht. Die Synthese von Farnesol, Squalen und Kauren in den einzelnen kombinierten Inkubationsansätzen wird allein durch Enzyme aus dem Endosperm von Cucurbita pepo verursacht. Schwankungen innerhalb der Synthese dieser Substanzen könnten auf einem unterschiedlichen Abzug von Substrat für Syntheseschritte durch Enzyme aus N.crassa beruhen. Die erhöhte Markierung von GG in P_{21} und P_{115} könnte auf einen erhöhten Substratdurchfluß für die Carotinoidsynthese zurückzuführen sein.

3.3.3. Photoregulation der Phytoen- und Carotinoidsynthese in einzelnen Zellfraktionen

Neben unterschiedlichen Enzymaktivitäten läßt sich in allen Fraktionen eine Photoregulation der Phytoen- und Carotinoidsynthese erkennen (Tab.15 und Abb.16). Ein geringer Anteil der Phytoensynthetase und offensichtlich auch der carotinoidbildenden Enzyme ist konstitutiv, also bereits im Dunkeln vorhanden. Nach Lichtinduktion ist die Markierung von Phytoen um ca. das 12-fache, die der Carotinoide um ca. das 8-fache in den Fraktionen P₁₃, P₂₁ und P₁₁₅ gesteigert; in den übrigen Fraktionen liegt eine geringere Steigerungsrate vor.

3.4. Carotinoidsynthese im zellfreien System

Während in vivo ¹⁴C-MVA gut in die Carotinoide eingebaut wird (Tab.6), war in vitro der Einbau in den bisherigen Versuchen viel schlechter (Tab.9 und 11).

In einigen orientierenden Versuchen sollte deshalb der ¹⁴C-MVA-Einbau in die Carotinoide im zellfreien System optimiert werden. Da der Anteil von Phytoen an den Gesamtcarotinoiden in vivo allein 54 % beträgt, mußte eine möglichst hohe ¹⁴C-Markierung vorliegen, um noch Radioaktivität in den Carotinoiden nachweisen zu können. Weiterhin mußte Phytoen, das als Substrat verwendet wird, in ausreichendem Maß vorliegen. Eine hohe Phytoensynthese konnte dabei unter Amo 1618 (Endkonzentration: 2×10^{-6} M) nach Zusatz eines GÜPP-synthetisierenden Systems aus Kürbisendosperm erreicht werden. Nun beeinflußt Amo 1618 zwar nicht die Phytoenbildung (Graebe, 1968), offensichtlich aber die verschiedenen Cyclasen, die für die Synthese einzelner Carotinoide verantwortlich sind (Tab.17). Ohne Zusatz von Amo 1618 ist die ¹⁴C-Markierung -als Maß für die Synthese der Carotinoide-um ca. das 3-fache in einzelnen partikulären Fraktionen aus *N.crassa* erhöht, der ¹⁴C-MVA-Einbau in Phytoen dagegen erniedrigt.

Eine Optimierung der Carotinoidsynthese könnte vielleicht auch durch eine längere Inkubationszeit erwartet werden. In einem

Tabelle 17:

Einfluß des Cyclaschemmstoffes Amo 1618 ($2 \times 10^{-6} \text{M}$) auf den ^{14}C -Gesamteinbau (Ipm/mg "pellet"-Protein) und die Synthese von Phytoen und Carotinoiden (Ipm/mg "pellet"-Protein) in verschiedenen Fraktionen aus *Neurospora crassa* nach 10-minütiger Enzymreaktion. Zusätzlich ist der ^{14}C -Einbau (Ipm) angegeben, der allein durch Enzyme aus dem Endosperm von *Cucurbita pepo* bewirkt wurde (2,5 Std. Vorinkubation).

Fraktion	Gesamteinbau		Phytoen			Carotinoide			
	+ AMO	- AMO	+ AMO	- AMO	- AMO	+ AMO	- AMO	- AMO	- AMO
	Ipm/mg Prot.	Ipm/mg Prot.	Ipm/mg Prot.	%	Ipm/mg Prot.	%	Ipm/mg Prot.	%	Ipm/mg Prot.
P _{2,3}	32 980	321 460	7 047	21,4	9 287	2,9	144	0,4	310
P ₁₃	93 500	351 400	44 558	47,7	37 035	10,5	692	0,7	2 315
P ₂₁	312 570	598 520	226 125	72,3	161 629	27,0	4 649	1,5	14 997
P ₁₁₅	277 120	545 300	204 939	74,0	160 688	29,5	2 760	1,0	7 008
ÜB ₁₁₅	34 360	316 660	1 705	5,0	2 429	0,8	124	0,4	607
	Ipm	Ipm	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm
Kürbis- endosperm	49 400	329 220	6 52	1,3	988	0,3	136	0,3	—

orientierenden Versuch war nach einer 3-stündigen Inkubation die Carotinoidsynthese (Ipm/mg Protein) um etwa das 4-fache gegenüber der ungereinigten Enzymlösung allein erhöht.

Nachdem mit Hilfe eines GGPP-synthetisierenden Enzymsystems aus Cucurbita pepo bereits eine gute Steigerung der ^{14}C -Markierung der Carotinoide erreicht werden konnte, könnte diese nach Zugabe von reinem ^{14}C -GGPP möglicherweise noch höher werden. Da nur eine geringe Menge von ^{14}C -GGPP zur Verfügung stand, konnte nur eine Inkubation mit der partikulären Fraktion P_{21} , die die höchste spezifische Carotinoidsynthesefähigkeit besitzt, ausgeführt werden. Zum Vergleich wurde ein rekombiniertes System aus N.crassa mitgeführt, dem ^{14}C -MVA als Ausgangssubstrat geboten wurde. Die Inkubationszeit betrug 60 min. Das Ergebnis ist in Tab.18 dargestellt. Bietet man ^{14}C -GGPP als Substrat, so läßt sich eine hohe ^{14}C -Markierung neben dem Phytoen vor allem in den Carotinoiden nachweisen. Gegenüber dem rekombinierten System ist die Synthese von Phytoen um das 13-fache, die der Carotinoide um das 63-fache gesteigert. Nach Zusatz von ^{14}C -GGPP werden auch die Sterine radioaktiv markiert; dies könnte damit erklärt werden, daß das isolierte GGPP durch FPP verunreinigt war.

Tabelle 18:

Vergleich der Phytoen- und Carotinoidsynthese nach Zugabe von ^{14}C -GGPP in der partikulären Fraktion P_{21} und ^{14}C -MVA im rekombinierten System nach 60-minütiger Inkubationszeit.

Inkubations- ansatz	Gesamtein- bau (Ipm)	Einhei- ten	Phytoen	Caroti- noide	GG	F	Präsqua- len + Squalen	Sterine
^{14}C -GGPP: P_{21}	124 000	Ipm/mg Prot.	54 586	22 063	29 043	1 003	4 820	11 241
		%	44,0	17,9	23,4	0,8	3,9	9,1
^{14}C -MVA: rekombinier- tes System	65 500	Ipm/mg Prot.	4 337	352	277	516	16 340	5 045
		%	15,9	1,3	1,0	1,9	59,8	18,5

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation der Carotinoide sowie der Ort ihrer photoregulierten Synthese bei *Neurospora crassa* untersucht. Damit sollte ein Beitrag zur weiteren Aufklärung des Mechanismus einer lichtregulierten Biosynthese an einem eukaryontischen Organismus geleistet werden. Enzymatische Teilschritte lassen sich mit Hilfe von zellfreien Systemen aufklären. Im Fall der photoregulierten Carotinoidsynthese konnte nun erstmals eine zellfreie Präparation aus einem eukaryontischen Organismus mit strikter photoregulierter Pigmentbildung gewonnen werden, die Carotinoide aus ^{14}C -MVA synthetisieren kann.

Wurde ein zellfreier Rohextrakt aus einem lichtinduzierten Mycel mit radioaktiv markiertem MVA inkubiert, so ist eine relativ hohe ^{14}C -Markierung in Squalen und den Sterinen, eine geringere in Phytoen und den Prenolen nachweisbar; die Synthese der ungesättigteren Carotinoide ist dagegen gering. Demgegenüber zeigen in vivo-Untersuchungen eine höhere Synthese der Carotinoide, wodurch offensichtlich die Zwischenstufen nur geringe "steady state level" aufweisen. Dies gilt offenbar auch für die Sterinsynthese; dabei häuft sich in vivo fast ausschließlich Ergosterin als Endprodukt an, während in vitro die Synthese nur bis zu den Vorstufen wie Squalen und 4-Monomethylsterinen verläuft (Zusammenfassung: Weete, 1973 und Grunwald, 1975). Ähnliche in vitro-Befunde ergaben sich auch bei einer sterinbildenden Mutante von *N. crassa* (Bobowski et al., 1977). Im vorliegenden in vitro-System sind möglicherweise Cyclasen innerhalb

der Carotinoid- und Sterinsynthese wenig aktiv, so daß sich die jeweiligen Vorstufen anhäufen. Eine verminderte Isomerase-Aktivität könnte zusätzlich im Fall der Carotinoidbildung die Synthese herabsetzen, da das isolierte Phytoen in der cis-Form vorliegt und für eine Weitersynthese die trans-Konfiguration erforderlich ist. Erwartungsgemäß sind in *N.crassa* die Carotinoide weit weniger markiert als die Sterine, weil im Mycel deren Anteil um ca. das 20-fache höher ist (Tsuda und Tatum, 1961; Mitzka und Rau, 1977); vom Gesamtcarotinoidgehalt beträgt darüberhinaus Phytoen ungefähr 50 % (Mitzka und Rau, 1977).

Phytoen ist die erste aus ^{14}C -MVA markierte C_{40} -Verbindung; hingegen konnte keine Radioaktivität in Lycopersen und Präphytoen *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden. Lycopersen stellt bei *N.crassa* offensichtlich keine obligate Zwischenstufe im Carotinoidbiosyntheseweg dar, wie dies bereits von anderen Arbeitsgruppen angenommen wurde (Davies et al., 1963; Lit.s.Goodwin, 1965a). Eine Synthese von Präphytoen beziehungsweise Prälycopersenpyrophosphat, wie sie bei *Mycobacterium* (Gregonis und Rilling, 1973) sowie Enzymen aus Hefe und Tomatenplastiden (Barnes et al., 1973; Qureshi et al., 1973) nachgewiesen wurde, ist zwar unwahrscheinlich, kann aber nicht absolut ausgeschlossen werden.

Bei einem Vergleich verschiedener *in vitro*-Systeme aus Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen weist die Präparation aus *N.crassa* einen signifikant höheren Einbau von ^{14}C -MVA in die Gesamtcarotinoide auf, als er für bakterielle Systeme aus *Staphylococcus* und *Halobakterium* (Suzue, 1962; Kushwaha et al., 1976) und teilweise für *Phycomyces* (Lee und Chichester, 1969) beschrieben wurde. Die carotinoidbildenden Enzyme aus *N.crassa* und einer *Phycomyces*-Mutante (Bramley und Davies, 1975) zeigen eine ähnliche Aktivitätsdauer. Solche Vergleiche bezüglich der Enzymaktivitäten sind jedoch mit Vorbehalt zu machen, da altersabhängige Aktivitätsänderungen wie sie für *N.crassa* aufgezeigt werden konnten, allgemein einen Einfluss haben dürften.

In den verschiedenen zellfreien Systemen lassen sich zwar Enzymaktivitäten für die Carotinoidbildung nachweisen, die Synthese selber aber ist in den einzelnen Organismen nicht photoinduziert. Über eine Lichtregulation von Enzymen der Carotinoidsynthese berichteten bisher nur Johnson et al. (1974) bei *Mycobacterium*. Durch in vivo-Untersuchungen konnte in Übereinstimmung mit früheren Befunden an *N.crassa* (Zalokar, 1954; Harding et al., 1969; Lansbergen et al., 1976) eine Lichtregulation der Carotinoidsynthese bekräftigt werden. Aus den gewonnenen Ergebnissen können zumindest zwei photo-regulierte Reaktionsschritte postuliert werden: die Phytoensynthese und die Phytoendehydrogenierung und damit die Synthese der ungesättigten Carotinoide. Mit Hilfe des Proteinsynthese-hemmstoffes Cycloheximid (CHI) konnte eine vollständige Hemmung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese gezeigt werden, wenn CHI vor Beginn der Belichtung zugegeben wird (Rau et al., 1968; Harding und Mitchell, 1968). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Carotinoidsynthese auf einer de novo-Proteinsynthese nach Belichtung beruht. Ein direkterer Nachweis einer Lichtregulation der Enzyme konnte nun mit Hilfe des in vitro-Systems aus *N.crassa* erstmals für einen eukaryontischen Organismus erbracht werden. Im Rohextrakt aus unbelichtetem Mycel erfolgt eine minimale Markierung von Phytoen aus ^{14}C -MVA, während nur Spuren von Radioaktivität in den Carotinoiden vorliegen (Tab.9 und 10). Eine partielle Phytoensynthese läuft also im Dunkeln ab, das entsprechende Enzym ist also teilweise konstitutiv. Durch Licht wird die Synthese von Phytoen und der ungesättigten Carotinoide um ca. das 10-fache gesteigert; dieser Anteil beruht allein auf einer lichtinduzierten, CHI-hemmbar und deshalb wahrscheinlichen de novo-Enzymsynthese.

Bei *Mycobacterium* ist die Präphytoensynthetase offensichtlich vollständig lichtinduziert, während die GGPP-Synthetase unter lichtinduzierten Bedingungen lediglich eine viel höhere Aktivität aufweist (Johnson et al., 1974). Über eine Photoregulation innerhalb der Prenole kann im Rohextrakt aus *N.crassa* keine gesicherte Aussage gemacht werden, weil offensichtlich ein

rascher turn-over dieser Substanzen vorliegt. Eine verminderte Sterinsynthese nach Belichtung stimmt mit in vivo-Befunden an *N.crassa* (Renaud et al., 1976), sowie an *Fusarium aquaeductum* (Bindl et al., 1970; Mende, 1976; Jochum, 1977), einem Pilz der ebenfalls eine obligat lichtabhängige Carotinoidsynthese aufweist, überein.

Der Nachweis aktiver carotinoidbildender Enzyme im Rohextrakt ermöglichte eine Untersuchung ihrer subzellulären Lokalisierung. Als wesentlich stellte sich die Frage, ob Synthese und Lokalisation der Carotinoide am selben Ort erfolgen. Bei Pilzen wurden Carotinoide bisher entweder nur in einem einzigen Organell wie Mitochondrien (Neupert und Ludwig, 1971; Keyhani et al., 1972), oder in mehreren und dabei vornehmlich in Lipidglobuli nachgewiesen (Zalokar, 1969; Herber, 1974; Riley and Bramley, 1976). Durch differentielle Zentrifugation wurden einzelne partikuläre Fraktionen gewonnen, in denen Mitochondrien (P_{13}) und mikrosomale Membranen (P_{115}) angereichert sind (Tab.1; Abb.4). Die partikulären Fraktionen P_{21} und P_{115} werden auf Grund ihrer Charakterisierung durch die NADPH- und teilweise NADH-Cyt.-c-Reduktase als Membranfraktionen bezeichnet. Eine P_{21} -Fraktion wurde zwar von Brain et al. (1977) bei *N.crassa* als "presumptive plasma membrane fraction" charakterisiert, enthält aber möglicherweise im Vergleich zur sogenannten Mikrosomalfraktion (P_{115}) nur größere Membranbruchstücke. Die Carotinoide sind neben den Lipidglobuli ganz eindeutig in den beiden Membranfraktionen P_{21} , die ebenfalls ER enthält, und besonders in P_{115} (Mikrosomalfraktion), die einen hohen Anteil an Leitenzymen für das Endoplasmatische Retikulum aufweist, angereichert (Tab.1; Abb.4). Die Pigmente der Mikrosomalfraktion sedimentieren im Saccharosedichtegradienten überwiegend bei einer geringen spezifischen Dichte, wie sie etwa einer leichten Membranfraktion des ER aus Pflanzen entspricht (Lord et al., 1972; Theimer und Rosnitschek, 1978). Ein geringer Anteil an Carotinoiden wurde in den Fraktionen $P_{2,3}$ und P_{13} wiedergefunden. Für die Mitochondrialfraktion konnte dabei deut-

lich gemacht werden, daß die Carotinoide nur in Spuren mit den ganzen Mitochondrien sedimentieren; ihre Verteilung im Gradienten ist ebenfalls mit einem typischen ER-Markerenzym koinzident (Abb.8; Tab.5). Darüberhinaus läßt sich die Vermutung bestärken, daß Teile des ER mit ganzen Mitochondrien in Kontakt stehen und mit diesen sedimentieren, da der Anteil der Gesamtcarotinoide bei einer mittleren Schwebedichte von $1,181 \text{ g/cm}^3$ in der Mikrosomalfraktion höher ist als in der Mitochondrialfraktion (Abb.7; Tab.5).

Der Hauptteil der Pigmente (ca. 58 %) ist in einer kompakten Lipidschicht lokalisiert (Tab.1), die vermutlich mit den Lipidglobuli von *Phycomyces* und *Mucor hiemalis* identisch ist und von Wanner (1977) bei der "slime"-Mutante von *Neurospora crassa* als Sphärosomen identifiziert wurden. Während Sphärosomen als Speicherstrukturen für Triglyceride bei höheren Pflanzen (Jacks et al., 1967) sowie Sterine und Phospholipide bei Pilzen (Schaffner, 1974) aufgezeigt wurden, konnten diese nun erstmals auch als Speicherstrukturen für Carotinoide bei *Neurospora crassa* nachgewiesen werden. Die Lipidschicht besitzt nur noch in einem minimalen Umfang die Fähigkeit zur Synthese von Phytoen, während Enzymaktivitäten für die Bildung der ungesättigteren Carotinoide gänzlich fehlen (Tab.11). Neben den Carotinoiden ist auch die Synthese der Sterine drastisch reduziert. Die gewonnenen Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, daß die Lipidschicht keine vollständige Enzymsausstattung für die Synthese von Carotinoiden und Sterinen besitzt, die Carotinoide aber offensichtlich speichert. Durch verschiedene Arbeitsschritte werden Carotinoide offenbar zusätzlich aus partikulären Fraktionen herausgelöst (Tab.4) und sammeln sich in der Lipidschicht. Ihr Carotinoidgehalt wächst mit zunehmendem Mycelalter. Wanner (1977) konnte bei der "slime"-Mutante von *N. crassa* eine altersabhängige Zunahme der Sphärosomen, die mit einer Reduktion des Endoplasmatischen Retikulums zusammenfällt, nachweisen und die offensichtliche Bildung der Sphärosomen am ER aufzeigen. Auf Grund dieser Ergebnisse nahm er an,

daß Sphärosomen möglicherweise als Speicherstrukturen für Lipide des ER dienen. Diese Annahme läßt sich durch die vorliegenden Ergebnisse für Carotinoide bestärken.

Wenn nun Sphärosomen am ER gebildet werden und Carotinoide nach Abschluß der Pigmentsynthese überwiegend in Sphärosomen vorliegen, sollte ihre Synthese möglicherweise ebenfalls am ER erfolgen. Das ER gilt dabei als Syntheseort für Proteine und Phospholipide (Lord et al., 1973). Die intrazelluläre Lokalisierung der carotinoidbildenden Enzyme war zunächst dadurch erschwert, daß ganz offensichtlich nicht alle Enzyme im Biosyntheseweg von MVA bis zu den Carotinoiden im gleichen Kompartiment vorliegen. Während die Inkubation der kombinierten partikulären Fraktionen keinen ^{14}C -Einbau erbrachte (Tab.13), ist in der löslichen Fraktion (ÜB₁₁₅) ebenso wie in der Lipidschicht der Einbau in Phytoen, die Carotinoide und Sterine drastisch erniedrigt. Die Prenole sind dagegen in der löslichen Fraktion geringfügig angereichert (Tab.11 und 12). Aus den gewonnenen Ergebnissen läßt sich folgern, daß die carotinoidbildenden Enzyme in der partikulären Fraktion lokalisiert sind. Ein Enzymsystem das GGPP und weitere Prenole synthetisiert, liegt dagegen in der löslichen Fraktion vor. Ähnlich wie bei Bakterien und höheren Pflanzen (Oster und West, 1968; Ogura et al., 1972; Johnson et al., 1974) sind Prenyltransferasen in *N.crassa* offensichtlich ebenfalls löslich. Einzelne Metabolite der Prenole wie FPP und GGPP akkumulieren offenbar nicht, unabhängig davon ob ein Substratabzug für eine Weitersynthese erfolgt (Tab.11). Zwischenstufen wie GPP lassen sich durch ^{14}C -Markierung nicht erfassen. Vergleichbare Befunde ergaben sich auch bei einem GGPP-synthetisierenden Enzymsystem aus Kürbisendosperm unter Amo 1618 (Tab.15). Dies deutet auf eine möglicherweise ähnlich geringe Spezifität einer oder mehrerer Prenyltransferasen hin, wie sie für GGPP-Synthetasen aus *Micrococcus lysodeikticus* (Kandutsch et al., 1964) und Kürbisfrüchten (Ogura et al., 1972) nachgewiesen wurde. Beide Enzyme können neben FPP auch IPP, DMAPP und GPP als Substrat

verwenden, wobei die Synthese nacheinander am Enzym ablaufen könnte und somit Zwischenprodukte nicht frei werden.

Durch Inkubation einzelner partikulärer Fraktionen mit einem G6PP-synthetisierenden System (lösliche Fraktion aus *N. crassa* bzw. zellfreier Extrakt aus Kürbisencosperm) in Gegenwart von ^{14}C -MVA ließ sich folgendes zeigen: die Enzyme für die Synthese von Phytoen und den ungesättigteren Carotinoiden sind pelletierbar und dabei an subzelluläre Fraktionen, die vermutlich Plasmamembranen und besonders ER enthalten, gebunden. Die Verteilung der Enzyme ist dabei offensichtlich spezifischer als die der Carotinoidpigmente (Tab.2 und 16): ca. 80 % der Enzymaktivitäten liegen in den Fraktionen P_{21} und P_{115} vor; letztere enthält die Hauptaktivität. Eine geringfügig höhere spezifische Aktivität in P_{21} ließe sich durch das Vorliegen größerer und dadurch möglicherweise intakterer Membranbruchstücke erklären.

Wenn der Wildstamm von *Neurospora* ein ähnliches Endomembransystem aufweist, wie es für die "slime"-Mutante postuliert wird (Wanner, 1977), wäre ein zeitweiser Kontakt von ER mit allen Zellorganellen vorhanden. Dadurch ließe sich auch eine geringe Enzymaktivität in den Fraktionen $P_{2,3}$ und P_{13} erklären. Für die Verteilung der Carotinoide konnte eine Verbindung von ER mit Mitochondrien wahrscheinlich gemacht werden (Abb.7 und 8; Tab.5). Demgegenüber erscheint die Kompartimentierung eines Enzyms, die andernfalls als Erklärung postuliert werden mußte, doch sehr unwahrscheinlich. Ergebnisse an grünen Pflanzen ergaben Hinweise auf eine mögliche Kompartimentierung von Sterin- und Carotinoidsynthese (Goodwin, 1958; Rogers et al., 1966a); die Autoren konnten dabei zeigen, daß $^{14}\text{CO}_2$ in Carotinoide und Sterine, angebotene MVA nur in Sterine eingebaut wird. Die Ursache dafür liegt in der Undurchlässigkeit der Chloroplastenmembran für MVA. Auf Grund der gewonnenen Ergebnisse, die zusätzlich den Nachweis von zwei Isoenzymen für die Phosphorylierung von MVA einschlossen, postulierten Threfall et al. (1967) zwei verschiedene Isoprenoidsyntheseorte in der Zelle grüner Pflanzen. Die vorliegenden Ergebnisse an *N. crassa*

sprechen nun eindeutig dafür, daß in diesem Organismus die Synthese von Sterinen und Carotinoiden in den gleichen Zellbestandteilen erfolgt. Möglicherweise liegen verschiedene Enzymaggregate in den Membranen vor, die dasselbe Substrat (FPP) verwenden.

Die Existenz eines Multienzymkomplexes für die Carotinoid-synthese wird zwar von De La Guardia et al. (1971) postuliert, konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden. Eine Lokalisation von sterinbildenden Enzymen vornehmlich in der Mikrosomalfraktion von *N.crassa* ist in Einklang mit Befunden an tierischen Organismen und höheren Pflanzen (Popják, 1969; Lit.s. Grunwald, 1975; Morré, 1975). Hingegen ist die Squalensynthetase bei *N.crassa* möglicherweise löslich.

Ein limitierendes Angebot an Prenolen, das offensichtlich in vivo und in vitro infolge einer erhöhten Sterinsynthese vorliegt, scheint für die geringe ^{14}C -Markierung der Carotinoide aus ^{14}C -MVA verantwortlich zu sein.

Mit Hilfe eines GGPP-synthetisierenden Enzymsystems aus Kürbisendosperm und durch reines ^{14}C -markiertes GGPP konnte die Synthese der Carotinoide um ein vielfaches gesteigert werden. Dies zeigt, daß im in vitro-System von *N.crassa* eine höhere Aktivität der carotinoidbildenden Enzyme vorliegt (Tab.17 und 18), als zunächst erkennbar war (Tab.11 und 14). Darüberhinaus unterliegt auch in den einzelnen partikulären Fraktionen die Synthese der Carotinoide einer deutlichen Photoregulation.

Enzympräparationen aus Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen unterscheiden sich also hinsichtlich der Lokalisation der carotinoidbildenden Enzyme. In Tomatenplastiden sind diese offenbar löslich (Shah et al., 1968). Befunde an Bakterien sind dagegen nicht ganz eindeutig. Bei Halobakterium ist zwar eine Carotinoidsynthese in der löslichen Fraktion nachweisbar (Kushwaha et al., 1976); die überwiegende Lokalisierung der Enzyme in der partikulären Fraktion läßt sich aber nicht aus-

schließen, da Prenyltransferasen ähnlich wie bei *Mycobacterium* (Johnson et al., 1974) und *Micrococcus* (Kandutsch et al., 1964) möglicherweise löslich sind und somit die Ursache für einen fehlenden ^{14}C -MVA-Einbau in die partikuläre Fraktion sein könnten.

Ein partiell gereinigtes Enzymsystem aus Tomatenplastiden vermag offensichtlich alle Syntheseschritte von IPP bis zum Phytoen durchzuführen (Maudinas et al., 1977). Für *N. crassa* liegt hingegen ein derartiger Enzymkomplex nicht vor.

V. Zusammenfassung

1. Ein wesentlicher Aspekt für die Aufklärung des Mechanismus der Photoregulation der Carotinoidsynthese ist die Frage nach dem Synthesort und der subzellulären Lokalisation der gebildeten Pigmente. Bisher beschriebene in vitro-Systeme für die Carotinoidsynthese aus Eukaryonten haben den Nachteil, daß die Pigmentbildung in den verschiedenen Organismen nicht photoinduziert ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, aus *Neurospora crassa*, einem eukaryontischen Organismus mit strikter photoregulierter Pigmentbildung, ein zellfreies System für die Carotinoidsynthese auszuarbeiten, um die intrazelluläre Lokalisation der carotinoidbildenden Enzyme und ihre Photoregulation zu untersuchen. Zusätzlich sollte die Verteilung der Pigmente nach Abschluß ihrer Synthese bestimmt werden. Befunde bezüglich der Lokalisation der Carotinoide bei Pilzen sind zum Teil widersprüchlich, während ihr Synthesort bisher gänzlich ungeklärt ist.
2. Nach Abschluß der lichtinduzierten Pigmentsynthese wurde das Mycel homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation fraktioniert. Neben einer löslichen Fraktion und einer Lipidschicht konnten dabei partikuläre Fraktionen, die in Bezug auf Mitochondrien^r und mikrosomale Membranen angereichert sind, gewonnen werden. Ihre Charakterisierung erfolgte durch Aktivitätsbestimmung verschiedener Leitenzyme für Mitochondrien und ER; die partikulären Fraktionen P₂₁ und P₁₁₅ werden als Membranfraktionen bezeichnet. Die

Mitochondrial-(P_{13}) und die Mikrosomalfraktion (P_{115}) wurden durch diskontinuierliche Saccharosedichtegradientenzentrifugation weiter gereinigt.

3. Die Carotinoide von *N.crassa* sind überwiegend (ca. 60%) in der Lipidschicht, die sich vermutlich aus Sphärosomen zusammensetzt, lokalisiert. Mit zunehmendem Alter läßt sich eine Anhäufung der Pigmente in dieser Schicht beobachten. Daneben sind die Carotinoide in den beiden Membranfraktionen angereichert und dabei mit einer mikrosomalen Fraktion, möglicherweise dem ER, assoziiert.
4. In Saccharosedichtegradienten sedimentieren die Carotinoide mit verschiedenen Membranfraktionen des ER, hauptsächlich aber bei einer Dichte von 1,076 beziehungsweise 1,085 g/cm³, wie sie einer leichten Membranfraktion des ER aus Pflanzen entspricht. Ganze Mitochondrien (Dichte 1,181 g/cm³) enthalten wahrscheinlich keine Carotinoide, möglicherweise aber Kontakte zum ER.
5. *N.crassa* baut ¹⁴C-MVA in vivo und in vitro mit guter Ausbeute in die nicht verseifbare lipophile Fraktion ein. Ein großer Teil der eingesetzten MVA fließt in den Sterinbiosyntheseweg. Nach chromatographischer Auftrennung wurde in vivo Radioaktivität in Squalen, Lanosterin, 4-Methylsterinen und ganz überwiegend in Ergosterin nachgewiesen. Ebenso häufen sich mit zunehmender Synthese die Carotinoidendprodukte gegenüber Vorstufen wie Phytoen an.
6. Durch das in vitro-System aus *N.crassa* werden ca. 22 % des eingesetzten aktiven MVA-Isomeren eingebaut. Die einbauenden Enzyme sind ungefähr 2-3 Std. aktiv. Eine hohe ¹⁴C-Markierung konnte nach Photoinduktion in Squalen und vornehmlich weiteren Sterinvorstufen, eine geringere in Phytoen und den Prenolen (Farnesol, Geranylgeraniol) nachgewiesen werden. Dagegen erfolgt nur eine geringe Synthese der Carotinoide.

Phapphytoen und Lycopersen wurden aus ^{14}C -MVA nicht markiert; beide Substanzen sind demnach bei *N.crassa* wahrscheinlich keine Zwischenprodukte der Carotinoidsynthese.

Ein wesentlicher Einfluß auf den ^{14}C -MVA-Einbau ergibt sich durch das Mycelalter und die eingesetzte Proteinmenge.

7. Ein direkterer Nachweis einer Lichtregulation einzelner Enzyme der Carotinoidsynthese konnte mit Hilfe des in vitro-Systems erstmals für einen eukaryontischen Organismus erbracht werden. Eine minimale Phytoensynthese läuft im Dunkeln ab, das entsprechende Enzym ist also teilweise konstitutiv. Spuren von Radioaktivität finden sich z.T. auch in den Carotinoiden. Durch Licht wird die Synthese von Phytoen und den ungesättigteren Carotinoiden um etwa das 10-fache gesteigert. Dieser Anteil beruht auf einer lichtinduzierten, Cycloheximid-hemmbar und damit wahrscheinlich de novo-Proteinsynthese. Eindeutige Aussagen über eine Photoregulation innerhalb der Prenole sind nicht möglich, da offensichtlich ein rascher turn-over dieser Substanzen vorliegt.
8. Die Enzyme im Biosyntheseweg von MVA bis zu den Carotinoiden liegen in verschiedenen Kompartimenten vor. In der Lipidschicht und der löslichen Fraktion ist die Synthese von Phytoen, Carotinoiden und Sterinen drastisch vermindert. Die Lipidschicht konnte somit als Speicherstruktur für Carotinoide nachgewiesen werden. Ein Enzymsystem, das GGPP und weitere Prenole synthetisiert, ist löslich. Durch Inkubation verschiedener partikulärer Fraktionen mit dem löslichen Anteil beziehungsweise einem GGPP-synthetisierenden Enzymsystem aus dem Endosperm unreifer Samen von *Cucurbita pepo* könnten die Enzyme für die Synthese von Phytoen und den ungesättigteren Carotinoiden eindeutig lokalisiert werden. Sie sind pelletierbar und an subzelluläre Fraktionen, die Plasmamembranen und besonders ER enthalten, gebunden.

Die Synthese von Carotinoiden und Sterinen erfolgt in den gleichen Zellbestandteilen. Die Squalensynthetase scheint löslich zu sein. Enzymaktivitäten werden durch die verschiedenen Arbeitsschritte nicht wesentlich beeinträchtigt.

Eine drastische Photoregulation ist ebenso in den carotinoidsynthetisierenden Fraktionen nachweisbar.

9. Durch Zugabe eines GGPP-synthetisierenden Enzymsystems aus Kürbisendosperm sowie durch reines ^{14}C -markiertes GGPP konnte infolge eines ausreichenden Substratangebotes die Carotinoidsynthese um ein Vielfaches gesteigert werden.

VI. Literaturverzeichnis

- Bandlow, W.: Biochim.Biophys.Acta 282, 105 (1972).
- Barnes, F.J., A.A.Qureshi, E.J. Semmler und J.W.Porter:
J.Biol.Chem. 248, 2768 (1973).
- Batra, P.P.: in "Photophysiology", ed.A.C.Giese, Bd.VI,
Academic Press, New York und London, p.47 (1971).
- Battersby, A.R.: in "Natural Substances Formed Biologically
from Mevalonic Acid" (Biochem.Soc.Symp.No.29),
ed.T.W.Goodwin; Academic Press, London, p.157 (1970).
- Bindl, E., W.Lang und W.Rau: Planta 94, 156 (1970).
- Bobowski, G.S., W.G.Barker and R.E.Subden: Can.J.Bot.55, 2137
(1977).
- Bracker, C.E., C.E.Heintz and S.N.Grove:Microscopie
Electronique, 103 (1970).
- Brain, R.D. and W.R.Briggs: Carnegie Institution of Washington
Year Book 75, p.372 (1976).
- Brain, R.D., J.A.Freeberg, C.V.Weiss and W.R.Briggs: Plant
Physiol. 59, 948 (1977).
- Bramley, P.M. and B.H.Davies: Phytochem.14, 463 (1975).
- Britton, G. and T.W.Goodwin: in "Methods in Enzymology", XVIII C,
Vitamins and Coenzymes, ed. Mc Cormick and L.D.Wright,
Academic Press, London, p.654 (1971).
- Buggy, M.J., G.Britton and T.W.Goodwin: Phytochem.13,
125 (1974).
- Charlton, J.M. K.J.Trehearne and T.W.Goodwin: Biochem.J.105,
205 (1967).
- Costes, C., C.Burghoffer, E.Carrayol, G.Ducet and M.Diano:
Plant Science Letters 6, 253 (1976).
- Davies, B.H., D.Jones and T.W.Goodwin: Biochem.J.87, 326 (1963).

- Davies, B.H.: Ber.Deutsch.Bot.Ges. 88, 7(1975).
- De Fabo, E.C., R.W.Harding and W.Shropshire, Jr.: Plant Physiol. 57, 440 (1976).
- De La Guardia, M.D., C.M.G.Aragon, F.J.Murillo and E.Cerdá-Olmedo: Proc.Nat.Acad.Sci.68, 2012 (1971).
- Dennis, D.T., C.D.Upper and C.A.West: Plant Physiol. 40, 948 (1965).
- Donaldson, R.P., N.E.Tolbert and C.Schnarrenberger: Arch. Biochem.Biophys. 152, 199 (1972).
- Dorsey, J.K., J.A.Dorsey and J.W.Porter: J.Biol.Chem.241, 5353 (1966).
- Douglas, T.J. and L.G.Paleg: Plant Physiol. 49, 417 (1972).
- Frost, L.C.: Neurospora Newsletters 1, 11 (1962).
- Goad, L.J. and T.W.Goodwin: Biochem.J. 99, 735 (1966).
- Goodwin, T.W.: Biochem.J. 70, 612 (1958).
- Goodwin, T.W.: in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", ed. T.W.Goodwin; Academic Press, London, p. 143 (1965a).
- Goodwin, T.W.: in "The Biochemistry of Chloroplasts", ed. T.W.Goodwin, Vol. 2, Academic Press, London, p.721 (1967).
- Goodwin, T.W.: in "Carotenoids", Chemische Reihe, Bd.23, ed.O. Isler; Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, p.577 (1971).
- Graebe, J.E.: Phytochem. 7, 2003 (1968),
- Graebe, J.E.: Planta 85, 171 (1969).
- Gray, J.C. and R.G.O.Kekwick: Biochim.Biophys.Acta 279, 290 (1972).
- Gregonis, D.E. and H.C.Rilling: Biochem.Biophys.Res.Commun.54, 449 (1973).
- Gregonis, D.E. and H.C.Rilling: Biochem. 13, 1538 (1974).
- Grob, E.C., K.Kirschner and F.Lynen: Chimia 15, 308 (1961).
- Grunwald, C.: Ann.Rev.Plant Physiol. 26, 209 (1975).
- Harding, R.W. and H.K.Mitchell: Arch.Biochem.Biophys.128, 814 (1968).
- Harding, R.W., P.C.Huang and H.K.Mitchell: Arch.Biochem. Biophys.129, 696 (1969).

- Herber, R.: D.ès Sc.Thesis, University of Nancy, France (1974).
- Jacks, T.J., L.Y.Yetsu and A.M.Altschul: Plant Physiol. 42, 585 (1967).
- Jesaitis, A.J., P.R.Heners, R.Hertel and W.R.Briggs: Plant Physiol. 59, 941 (1977).
- Jochum, M.: Dissertation, Universität München (1977).
- Johnson, J.H., B.C.Reed and H.C.Rilling: J.Biol.Chem.249, 402 (1974).
- Kandutsch, A.A., H.Paulus, E.Levin and K.Bloch: J.Biol.Chem. 239, 2507 (1964).
- Keyhani, J., E.Keyhani and S.H.Goodgal: Eur.J.Biochem.27, 527 (1972).
- Kobr, M.J., F.Vanderhaeghe and G.Combevine: Biochem.Biophys. Res.Commun.37, 640 (1969).
- Kushwaha, S.C., G.Suzue, C.Subbarayan and J.W.Porter: J.Biol.Chem. 245, 4708 (1970).
- Kushwaha, S.C., M.Kates and J.W.Porter: Can.J.Biochem.54, 816 (1976).
- Landsbergen, J.C., R.L.Renaud and R.E.Subden: Can.J.Bot.54, 2445 (1976).
- Lang, B., G.Burger and W.Bandlow: Biochim.Biophys.Acta 368, 71 (1974).
- Lee, T.C. and C.O.Chichester: Phytochem.8, 603 (1969).
- Lee, T.C., T.H.Lee and C.O.Chichester: Phytochem. 11, 681 (1972).
- Lord, J.M., T.Kagawa and H.Beevers: Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69, 2429 (1972).
- Lord, J.M., T.Kagawa, T.S.Moore and H.Beevers: J.Cell Biol.57, 659 (1973).
- Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall: J.Biol.Chem.193, 265 (1951).
- Lück, H.: in "Methods of Enzym. Analysis", ed. H.U.Bergmeyer; Academic Press, New York, p. 885 (1965).
- Maudinas, B., M.L.Bucholtz, C.Papastephanou, S.S.Katiyar, A.V. Briedis and J.W.Porter: Arch.Biochem.Biophys.180, 354 (1977).

- Maxwell, D.P., M.D.Maxwell, G.Hänssler, V.N.Armentrout, G.M.
Murray und H.C.Hoch: *Planta* 124, 109 (1975).
- Mende, W.: Dissertation, Universität München (1976).
- Mercer, E.I. and M.W.Johnson: *Phytochem.* 8, 2329 (1969).
- Mitzka, U.: Diplomarbeit, Universität München (1973).
- Mitzka, U. and W.Rau: *Arch.Microbiol.* 111, 261 (1977).
- Mohr, H., H.Drumm und H.Kasemir: *Ber.Deutsch.Bot.Ges.* 87,
49 (1974).
- Morré, D.J. and H.H.Mollenhauer: in "Dynamic aspects of plant
ultrastructure", ed. A.W.Robards, Mc. Graw-Hill Book
Co. London, p. 84 (1974).
- Morré, D.J.: *Ann.Rev.Plant Physiol.* 26, 441 (1975).
- Nandi, D.L. and J.W.Porter: *Arch.Biochem.Biophys.* 105,
7 (1964).
- Neupert, W. and G.D.Ludwig: *Eur.J.Biochem.* 19, 523 (1971).
- Ogura, K., T.Sinka and S.Seto: *J.Biochem.* 72, 1101 (1972).
- Oster, M.O. and C.A.West: *Arch.Biochem.Biophys.* 127, 112 (1968).
- Popják, G.: in "Methods in Enzymology", XV, Steroids and
Terpenoids, ed. R.B.Clayton; Acad.Press, New York and
London, p. 393 (1969).
- Popják, G., J.Edmond, K.Clifford and V.Williams: *J.Biol.Chem.*
244, 1897 (1969).
- Porter, J.W. and D.G.Anderson: *Ann.Rev.Plant Physiol.* 18,
197 (1967).
- Potty, V.H. and J.H.Brueemmer: *Phytochem.* 9, 99 (1970).
- Qureshi, A.A., F.J.Barnes, E.J.Semmler and J.W.Porter:
J.Biol.Chem. 248, 2755 (1973).
- Qureshi, A.A., M.Kim. N.Qureshi and J.W.Porter: *Arch.Biochem.*
Biophys. 162, 108 (1974).
- Racker, E.: *Biochim.Biophys.Acta* 4, 211 (1950).
- Rau, W.: *Planta* 72, 14 (1967a).
- Rau, W.: *Planta* 74, 263 (1967b).
- Rau, W., I.Lindemann und A.Rau-Hund: *Planta* 80, 309 (1968).
- Rau, W.: *Ber.Deutsch.Bot.Ges.* 88, 45 (1975).
- Rau, W. and A.Rau-Hund: *Planta* 136, 49 (1977).

- Renaud, R., S.Safe and R.Subden: *Phytochem.* 15, 977 (1976).
- Riley, G.J.P. and P.M.Bramley: *Biochim.Biophys.Acta* 450, 429 (1976).
- Rilling, H.C.: *Biochim.Biophys.Acta* 79, 464 (1964).
- Rilling, H.C.: *J.Biol.Chem.* 241, 3233 (1966).
- Rogers, L.J., S.P.J. Shah and T.W.Goodwin: *Biochem.J.* 99, 381 (1966a).
- Rosnitschek, I.: Dissertation, Universität München (1977).
- Scarborough, G.A.: *J.Biol.Chem.* 250, 1106 (1975).
- Schaffner, N., Thesis No.5287 ETH Zürich, (1974).
- Schnarrenberger, C. and H.Mohr: *Planta* 94, 296 (1970).
- Schnarrenberger, C., A.Oeser and N.E.Tolbert: *Plant Physiol.* 48, 566 (1971).
- Schrott, E.L. and W.Rau: *Planta* 136, 46 (1977).
- Schulze, H.-U. und H.Staudinger: *Naturwiss.* 62, 331 (1975).
- Shah, D.V., D.H.Feldbruegge, A.R.Houser and J.W.Porter: *Arch.Biochem.Biophys.* 127, 124 (1968).
- Shewry, P.R. and A.K.Stobart: *Plant Science Letters* 1, 473 (1973).
- Sottocasa, G.L., B.Kuylenstierna, L.Ernster and A.Bergstrand: *J.Cell.Biol.* 32, 415 (1967).
- Suzue, G.: *J.Biochem.* 51, 246 (1962).
- Than, A., P.M.Bramley, B.H.Davies and A.F.Rees: *Phytochem.* 11, 3187 (1972).
- Theimer, R.R. and H.Beevers: *Plant Physiol.* 47, 246 (1971).
- Theimer, R.R.: in "Yeast, Mold and Plant Protoplasts; ed. Garcia-Acha, Academic Press, New York, p. 247 (1973).
- Theimer, R.R. and I.Rosnitschek: *Planta* 139, 249 (1978).
- Threfall, D.R., W.T.Griffiths and T.W.Goodwin: *Biochem.J.* 103, 831 (1967).
- Tsuda, S. and E.L.Tatum : *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 11, 171 (1961).
- Vogel, H.J.: *Microbiol.Genet.Bull.* 13, 42 (1956).
- Wanner, G.: Dissertation, Universität München (1977).
- Wardale, D.A., E.A.Lambert and T. Galliard: *Phytochem.* 17, 205 (1978).

Weeks, O.B., F.K.Saleh, M.Wirahadikusumah and R.A.Berry:

Pure Appl.Chem.35, 63 (1973).

Weete, J.D.: Phytochem.12, 1843 (1973).

Yokoyama, H., T.O.M. Nakayama and C.O.Chichester: J.Biol.

Chem.237, 681 (1962).

Zalokar, M.: Arch.Biochem.Biophys. 50, 71 (1954).

Zalokar, M.: J.Cell Biol.41, 494 (1969).

Herrn Prof.Dr.W.Rau, der mir freundlicherweise das Thema überließ, bin ich für die stets großzügige Förderung dieser Arbeit und seine hilfsbereite Anteilnahme an allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof.Dr.R.K.Theimer und seinen Mitarbeitern möchte ich für ihre hilfsbreite Unterstützung und die vielen praktischen Ratschläge herzlich danken.

Herrn Prof.Dr.W.Rüdiger danke ich sehr für die Überlassung von ^{14}C -markiertem GGPP.

Herrn Dr.Bandlow bin ich für wertvolle Hinweise dankbar.

Frau U.Hof danke ich besonders für die sorgfältige und gewissenhafte Assistenz bei einem Teil der Versuche.

Dem Botanischen Garten München danke ich für die Möglichkeit Kürbispflanzen anzubauen.

Lebenslauf

Ursula Mitzka-Schnabel, geboren am 28.9.1947 in Hauzenberg/
geb. Mitzka Passau; seit Oktober 1977 verheiratet mit Dipl.Physiker Dr.Dieter Schnabel. Eltern: Gerhard Mitzka, kaufm.Abschließungsleiter und Maria, geb.Filusch.

Schulbildung 1954-59 Volksschule in Germannsdorf
1959-68 Neusprachliches Gymnasium in Passau und München-Pasing
1968 Abitur in München

Studium 1968-73 Universität München und Köln
Studienfächer Biologie und Chemie
1970 Vordiplom in Biologie
1973 Diplomhauptprüfung in Biologie
Staatsexamen in Biologie und Chemie für Gymnasien

Diplomarbeit 1973 bei Prof.Dr.W.Rau (Botanisches Institut)

Promotion 1974 Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof.Dr.W.Rau

Zur Zeit bin ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Botanischen Institut bei Prof.Dr.W.Rau beschäftigt.

